

**PENGARUH PEMBERIAN ECHINACEA TERHADAP  
SEBUKAN LIMFOSIT DAN SEKRESI PERFORIN SEL  
MONONUKLEAR PADA MENCIT DENGAN  
ADENOKARSINOMA PAYUDARA YANG DIBERI  
STRES**

*THE EFFECT OF ECHINACEA ON LYMPHOCYTE  
INFILTRATION AND MONONUCLEAR PERFORIN  
SECRETION IN MICE WITH BREAST ADENOCARCINOMA  
AND STRESS*



**Tesis**

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

**Bernardus Parish Budiono**

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

**Tesis**

**PENGARUH PEMBERIAN ECHINACEA TERHADAP  
SEBUKAN LIMFOSIT DAN SEKRESI PERFORIN SEL  
MONONUKLEAR PADA MENCIT DENGAN  
ADENOKARSINOMA PAYUDARA YANG DIBERI STRESOR**

Disusun oleh

**Bernardus Parish Budiono**

Telah dipertahankan didepan tim penguji  
Pada tanggal 15 September 2008

Pembimbing I

Pembimbing II

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

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

Mengetahui :

Ketua  
Program Studi PPDS I Bedah  
Universitas Diponegoro

Ketua  
Program Studi Magister Ilmu Biomedik  
Program Pasca Sarjana  
Universitas Diponegoro

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

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

**PERNYATAAN**

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

Semarang, 7 September 2008

Penulis

## RIWAYAT HIDUP SINGKAT

### A. IDENTITAS

Nama : dr. B. Parish Budiono  
NIM Magister Biomedik : G4.A0.02.090  
NIM PPDS I Bedah : G3.A0.03.003  
Tempat / Tgl lahir : Yogyakarta, 17 Maret 1973  
Agama : Katolik  
Jenis kelamin : Laki-laki  
Istri : dr. Siska Liana G  
Anak : Callista Cherise Budiono

### B. Riwayat Pendidikan

1. SD Tarakanita Magelang, Jawa Tengah : Lulus tahun 1985
2. SMP Tarakanita Magelang, Jawa Tengah : Lulus tahun 1988
3. SMA Kolese Loyola Semarang, Jawa Tengah : Lulus tahun 1991
4. FK Unika Atma Jaya Jakarta : Lulus tahun 1999
5. PPDS I Bedah FK UNDIP Semarang, Jawa Tengah
6. Magister Ilmu Biomedik Pasca Sarjana UNDIP Semarang Jawa Tengah

## KATA PENGANTAR

Puji Syukur dipanjatkan kehadirat Tuhan YME atas limpahan rahmat dan anugerahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul “Pengaruh pemberian Echinacea terhadap sebukan sel limfosit dan sekresi perforin sel mononuclear pada mencit C3H dengan karsinoma payudara yang diberi stress”

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

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

Dalam kesempatan ini penulis juga menghaturkan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. dr. Susilo Wibowo, SpAnd, Rektor Universitas Diponegoro Semarang.
2. Prof. Drs. Y. Warella, MPA, PhD, Ketua Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro Semarang.
3. dr. Soejoto, SpKK(K), Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

4. Prof. dr. H. Soebowo, SpPA(K), Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro Semarang.
5. Prof. Dr. dr. Tjahjono, SpPA(K) FIAC, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran UNDIP / RS Dr. Kariadi Semarang.
6. dr. Djoko Handojo, SpB, SpBOnk, Ketua Bagian Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP dr. Kariadi Semarang.
7. dr. Sidharta Darsojono, SpB, SpU, Ketua Program Studi PPDS I Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
8. dr. Harijadi , SpPA(K), Kepala Instalasi Patologi Anatomi RSU Sardjito FK UGM Yogyakarta.
9. dr. Siti Amarwati, SpPA(K), Ahli Patologi Anatomi RS. Dr. Kariadi / FK UNDIP Semarang.
10. Tim penguji dan dan nara sumber yang telah dengan sabar berkenan memberi masukan, arahan dalam penelitian dan penulisan tesis ini.
11. Semua rekan sejawat Residen Bedah FK UNDIP yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.
12. Ucapan terima kasih khusus kepada orang tua dan mertua saya, istriku tercinta Siska dan anakku tersayang Cherise, yang telah memberikan dukungan moril dan material untuk keberhasilan studi saya.

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

Semarang, 7 September 2008

Penulis

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP SINGKAT.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
ABSTRAK.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. PENDAHULUAN .....	1
1.1 LATAR BELAKANG.....	1
1.2 PERUMUSAN MASALAH.....	4
1.3 TUJUAN PENELITIAN.....	4
1.3.1 TUJUAN UMUM.....	4
1.3.2 TUJUAN KHUSUS.....	4
1.4 MANFAAT PENELITIAN.....	5
1.5 ORISINALITAS.....	5
2. TINJAUAN PUSTAKA .....	7
2.1 KAKER PAYUDARA.....	7
2.1.1 Anatomi dan Histologi .....	7

2.1.2	Insidens dan Epidemiologi .....	9
2.1.3	Etiologi dan Patogenesis .....	10
2.1.4	Klasifikasi .....	12
2.1.5	Stadium klinik kanker payudara .....	16
2.2	RESPON IMUNOLOGI TERHADAP SEL TUMOR.....	19
2.2.1	Respon imunologi terhadap sel tumor.....	19
2.2.2	Peran perforin pada respon imunologi .....	27
2.3	PENGARUH STRESS TERHADAP RESPON IMUNOLOGI.....	29
2.4	ECHINACEA SEBAGAI IMMUNOSTIMULATOR .....	33
2.4.1	Sejarah dan penggunaan Echinacea .....	33
2.4.2	Biokimia dari Echinacea .....	35
2.4.3	Echinacea sebagai Immunostimulator .....	37
2.4.4	Keamanan dan toksisitas Echinacea .....	40
2.4.5	Dosis dan cara pemberian .....	41
3.	KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS .....	43
3.1	Kerangka teori .....	43
3.2	Kerangka konsep .....	44
3.3	Hipotesis .....	44
4.	METODE PENELITIAN .....	45
4.1	Ruang lingkup penelitian .....	45
4.2	Tempat dan waktu penelitian .....	45
4.3	Jenis dan rancangan penelitian .....	45
4.4.	Besar sampel .....	46
4.4.1	Metode alokasi kelompok .....	47

4.5	Variabel penelitian .....	47
4.5.1	Variabel bebas .....	47
4.5.2	Variabel terikat .....	47
4.6	Definisi operasional .....	47
4.7	Bahan dan cara kerja .....	49
4.7.1	Bahan .....	49
4.7.2	Cara kerja .....	49
4.8	Alur penelitian .....	57
4.9	Analisa data .....	58
4.10	Etika Penelitian.....	58
5.	HASIL.....	59
5.1.	Sebukan sel limfosit dan produksi perforin.....	59
5.2	Hasil pengukuran sebukan sel limfosit dan produksi perforin .....	61
6.	PEMBAHASAN.....	64
7.	SIMPULAN DAN SARAN.....	69
7.1.	Simpulan.....	69
7.2.	Saran.....	69
	DAFTAR PUSTAKA.....	70
	LAMPIRAN.....	78

**DAFTAR TABEL**

Tabel 1. Orisinalitas penelitian.....	5
Tabel 2. Sistem staging kanker payudara.....	18
Tabel 3. Derajat histologis adenokarsinoma payudara.....	18
Tabel 4. Sebaran sel limfosit dan perforin pada tiap kelompok percobaan.....	61

**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 1.	Anatomi kelenjar payudara.....	8
Gambar 2.	Reaksi imunologis T-Cell mediated.....	26
Gambar 3.	Tahapan sitolitik sel target oleh CTLs.....	26
Gambar 4.	Peran perforin dalam mekanisme kematian sel target.....	28
Gambar 5.	Peran perforin dalam eliminasi sel kanker.....	28
Gambar 6.	Mekanisme yang terjadi pada stress dan sistem imun.....	29
Gambar 7.	Fungsi sel-sel Th1 .....	32
Gambar 8.	Fungsi sel-sel Th2 .....	33
Gambar 9.	Echinacea purpurea .....	35
Gambar 10.	Pengaruh echinacea terhadap makrofag .....	37
Gambar 11.	Diagram skematik hasil penelitian.....	60
Gambar 12.	Hasil <i>post hoc test</i> sebaran sel limfosit.....	62
Gambar 13.	Hasil <i>post hoc test</i> perforin.....	63

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
Lampiran 1. Gambar sebukan limfosit.....	78
Lampiran 2. Gambar sekresi perforin.....	79
Lampiran 3. <i>Ethical Clearance</i> .....	80
Lampiran 4. Analisis Statistik.....	81

## ABSTRAK

**Latar belakang :** Echinacea (*Coneflower*) adalah tanaman obat yang banyak digunakan di Amerika Utara untuk pengobatan demam dan infeksi pernafasan dimana mengandung senyawa aktif polisakarida yaitu *Arabinogalactan*, *Echinacin* dan *Xyloglycan* yang dipercaya mempengaruhi sistem imunologi. Adanya stres sangat berpengaruh terhadap imunitas tubuh melalui stimulasi sekresi kortisol dan adrenalin dari korteks dan medula adrenal yang akan menekan imunitas. Diharapkan pemberian Echinacea akan memberikan manfaat berupa peningkatan aktivitas sistem imun khususnya sistem imun seluler

**Tujuan :** Membuktikan pengaruh Echinace terhadap perbedaan sebulan limfosit dan sekresi perforin pada mencit C3H karsinoma payudara yang diberi stres.

**Metoda :** *Post test only controled group design* pada hewan coba mencit C3H. Kelompok kontrol : mencit C3H , kelompok 1: mencit C3H yang diberi stress renjatan listrik, kelompok 2: mencit C3H yang diberi stress renjatan listrik dan Echinacea. Setelah inokulasi tumor, diberikan perlakuan, kemudian diukur jumlah sebulan limfosit disekitar sel tumor dan sekresi perforin. Dilakukan uji *One way Anova* dan uji beda untuk masing-masing kelompok dengan menggunakan *Post Hoc Bonferoni Test*

**Hasil :** Terdapat perbedaan bermakna pada jumlah sebulan limfosit di sekitar sel tumor pd seluruh kelompok perlakuan. (Kontrol : 66,2%; Perlakuan 1 : 16,7%; Perlakuan 2 : 47,8%) dengan  $p=0,001$ . Didapat perbedaan bermakna sekresi perforin ( $p=0,001$ ) pada kelompok kontrol (9,1) dan perlakuan 1 (7,8) dan kelompok perlakuan 1 (7,8) dan perlakuan 2 (8,7). Tidak didapat perbedaan bermakna ( $p=0,183$ ) pada kelompok kontrol (9,1) dan perlakuan 2 (8,7).

**Simpulan :** Terdapat peningkatan yang signifikan antara sebulan sel limfosit disekitar sel kanker dan sekresi perforin mencit yang diberi Echinacea sp dibanding yang tanpa pemberian Echinacea sp.

**Kata kunci :** Echinacea sp, sebulan limfosit, sekresi perforin, adenokarsinoma mammae

## ABSTRACT

**Background :** *Echinacea (Coneflower) is a plant widely used in North America to treat fever and respiratory infections. Its active polysaccharide compounds, Arabinogalactan, Echinacin and Xyloglycan are believed to affect the immunology system. Those compounds can stimulate the production of certain cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, Interferon- $\beta$ ), macrophages and have toxic effects on certain tumors. The presence of stress can affect the body's immunity through the stimulation of cortisol and adrenalin secretion from the cortex and medulla of the adrenal glands, which in turn will depress the immunity. It is hoped that the introduction of Echinacea to breast carcinoma patients with stress will enhance the immune system, especially the cellular immune system.*

**Objectives :** *To evaluate the influence of Echinacea on lymphocyte infiltration and perforin secretion in C3H mice with breast carcinoma and stress.*

**Methods:** *Post test only control group design experiment in C3H mice. Control group: standard C3H mice, group 1: C3H mice with stress aroused by applying electric shock, group 2: C3H mice with stress aroused by applying electric shock and treated with Echinacea. After tumor inoculation, the subjects are treated accordingly, and afterwards lymphocyte infiltrations around the tumor and perforin secretions were measured. One way Anova test and difference test were applied for each group by using Post Hoc Bonferoni Test.*

**Results:** *There was a significant difference in lymphocyte infiltrations around the tumor cells among the groups (Control group : 66,2%; Group 1 : 16,7%; Group 2 : 47,8%) with  $p=0,00$ ). There was a significant difference in perforin secretion ( $p=0,001$ ) between control group (9,1) and group one (7,8) and between group one (7,8) and group two (8,7), but no significant difference ( $p=0,183$ ) between control group (9,1) and group 2 (8,7).*

**Conclusion:** *There was a significant elevation of lymphocyte infiltrations around cancer cells and perforin production in mice treated with Echinacea sp compared with untreated ones.*

**Keywords:** *Echinacea sp, lymphocyte infiltration, perforin secretion, breast adenocarcinoma.*

# **BAB 1**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1. Latar Belakang**

Kanker merupakan salah satu penyakit yang menjadi penyebab kematian kedua tertinggi setelah penyakit kardiovaskuler. Di Indonesia prevalensi penderita kanker cenderung meningkat seiring dengan meningkatnya angka harapan hidup dan perubahan pola penyakit<sup>1,2</sup>.

Insiden kanker payudara di dunia relatif tinggi, dilaporkan kejadian kanker payudara adalah 20% dari seluruh keganasan. Di Amerika Utara kanker payudara merupakan 1 dari 3 kasus baru keganasan pada wanita. Hal ini menunjukkan bahwa kanker payudara merupakan keganasan yang paling sering dijumpai pada wanita<sup>3</sup>. Penelitian sebelumnya melaporkan dari 600.000 kasus baru kanker payudara yang didiagnosis setiap tahunnya, kurang lebih 350.000 kasus ditemukan di negara maju, sedangkan 250.000 kasus ditemukan di negara berkembang<sup>4</sup>.

Di Indonesia berdasarkan pemeriksaan patologi kejadian kanker payudara sejak tahun 1988 sampai dengan 1991 menempati peringkat kedua setelah kanker leher rahim dengan angka kejadian berkisar 17% sampai dengan 19%<sup>2</sup>. Data Badan Registrasi Kanker Ikatan Ahli patologi Indonesia (BRK-IAPI) tahun 1994 menunjukkan bahwa kanker payudara tetap menduduki peringkat ke-2 tertinggi setelah keganasan pada wanita kanker leher rahim dengan angka kejadian 17,1% dari keseluruhan kanker pada wanita<sup>5</sup>. Penelitian di Semarang melaporkan pada tahun 2001 ditemukan kasus kanker payudara sebanyak 769 kasus, dan masih

sama dengan tahun-tahun sebelumnya berada pada peringkat ke-2 tertinggi kasus keganasan pada wanita setelah kanker leher rahim<sup>6</sup>. Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 2002 jumlah kasus kanker payudara yang dilaporkan oleh rumah sakit di Jawa Tengah adalah lebih tinggi dibanding kanker leher rahim, dimana jumlah kasus kanker payudara 3.593 (43,91%) dibanding kanker leher rahim sebanyak 2.780 kasus (33,98%)<sup>7</sup>. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa 70% penderita kanker payudara ditemukan pada stadium lanjut<sup>4</sup>. Data Direktorat Jendral Pelayanan Medik Departemen Kesehatan Republik Indonesia menunjukkan bahwa *Case Fatality Rate* (CFR) kanker payudara menunjukkan peningkatan yaitu 3,8 pada tahun 1992 menjadi 7,8 pada tahun 1993. Kanker payudara apabila ditemukan saat stadium dini maka angka harapan hidup pasien adalah tinggi yaitu berkisar 85 sampai dengan 95%<sup>1</sup>.

Kanker payudara seperti halnya dengan keganasan yang lain akan menstimulasi respon imun baik imunitas seluler maupun humoral. Hal ini disebabkan oleh karena sel kanker walaupun merupakan derivat sel tubuh sendiri, akan sel kanker akan mengekspresikan molekul yang akan dikenali oleh sistem imun sebagai benda asing. Pada dasarnya respon imun terdiri atas 3 fase yaitu: pengenalan, aktivasi dan efektor. Respon imun terutama tergantung pada tiga tipe sel yaitu makrofag, limfosit T, dan limfosit B. Sel makrofag berperan sebagai sel penyaji antigen agar antigen dapat dikenali oleh sistem imun. Ada beberapa mekanisme efektor yang berperan terhadap sel kanker yaitu sel limfosit T sitotoksik (*Cytotoxic Toxic Lymphocyte=CTL*), *Natural Killer Cell* (NK Cell), sel makrofag dan antibodi<sup>8</sup>. Respon imun terhadap sel kanker dimulai dengan

pengenalan antigen sel kanker oleh Limfosit T melalui mekanisme penyajian antigen oleh sel makrofag, selanjutnya akan terjadi aktivasi respon imun berupa proliferasi limfosit. Selanjutnya akan diaktifkannya mekanisme efektor untuk mengeliminasi sel kanker<sup>8</sup>.

Sebaran limfosit disekitar sel kanker akan menyebabkan penurunan kecepatan pertumbuhan sel kanker. Pada penelitian *in vitro* adanya sel sistem imun disekitar sel kanker menyebabkan kematian sel kanker<sup>8</sup>.

Sel imun khususnya limfosit T sitotoksik (CTL), Sel NK (*Natural Killer*) dan makrofag berperan dalam *immuno surveillance* terhadap sel kanker. Setelah pengenalan sel kanker sebagai sel asing, sel-sel imun tersebut akan menghancurkan sel kanker<sup>8,9,10</sup>. Sel makrofag menghancurkan sel kanker dengan cara fagositosis. Sedangkan CTL dan sel NK menggunakan mekanisme yang berbeda untuk membunuh sel target yaitu dengan cara mensekresikan perforin dan granzyme serta menggunakan reseptor famili TNF seperti Fas, TNF serta *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) untuk menginduksi apoptosis<sup>9,10,11</sup>. Perforin juga berperan dalam penghancuran sel kanker yang metastasis oleh sel NK<sup>12</sup>.

Stress sangat berpengaruh terhadap sistem imun tubuh melalui mekanisme neuroendokrion. Pada kondisi stress akan terjadi penurunan respon sistem imun. Adanya stress pada penderita kanker payudara akan memberikan efek negatif pada sistem imun<sup>13</sup>.

Echinacea merupakan tanaman yang berasal dari daerah Eropa dan Amerika Utara. Dewasa ini Echinacea banyak digunakan sebagai obat untuk menstimulasi

sistem imun atau imunostimulator. Hasil penelitian sebelumnya melaporkan bahwa Echinacea dapat stimulasi sistem imun seluler melalui mekanisme non spesifik. Selain itu dilaporkan juga bahwa Echinacea dapat meningkatkan sekresi sitokin yaitu TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-5 dan IL-10.<sup>14,15</sup>

Berdasarkan hal tersebut diatas diperkirakan pemberian Echinacea pada penderita kanker payudara yang melami stress akan memberikan manfaat berupa peningkatan aktivitas sistem imun khususnya sistem imun seluler. Walaupun demikian manfaat pemberian Echinacea pada penderita kanker payudara yang melalui stress belum pernah dilaporkan sebelumnya sehingga memerlukan penelitian lebih lanjut. Menimbang manfaat maupun efek samping pemberian Echinacea pada penderita kanker payudara belum banyak diketahui, maka perlu dilakukan penelitian awal dengan menggunakan binatang percobaan.

## **1.2. Perumusan Masalah**

Apakah sebaran limfosit disekitar sel kanker payudara dan sekresi perforin oleh sel mononuklear (Sel NK dan CTL) pada mencit C3H dengan kanker payudara dengan stress yang mendapat Echinacea lebih tinggi dibanding yang tidak mendapat Echinacea?

## **1.3. Tujuan Penelitian**

### **1.3.1. Tujuan umum**

Membuktikan manfaat pemberian Echinacea sebagai imunostimulator terhadap imunitas seluler pada mencit C3H dengan kanker payudara yang mengalami stres.

### **1.3.1. Tujuan khusus**

1. Membuktikan pengaruh pemberian Echinacea terhadap derajat sebaran sel limfosit disekitar sel kanker mencit C3H kanker payudara dengan stress
2. Membuktikan pengaruh pemberian Echinacea terhadap jumlah sel mononuklear (Sel NK dan CTL) yang mensekresi perforin disekitar sel kanker mencit C3H kanker payudara dengan stress

#### 1.4. Manfaat Penelitian

1. Hasil penelitian diharapkan dapat menjadi bahan informasi tentang penggunaan imunomodulator dalam terapi kanker payudara khususnya pada pasien yang mengalami stress sehingga terjadi penurunan sistem imun seluler.
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi landasan untuk penelitian lebih lanjut mengenai pengelolaan kanker payudara pada manusia, dimana Echinacea dapat dipergunakan sebagai suplemen terapi pembedahan dan atau radioterapi

#### 1.5. Orisinalitas

**Tabel 1.** Orisinalitas Penelitian

Penulis	Judul / penerbit	Hasil
See D, Broumand N, Sahl L, Tilles J. <sup>16</sup>	In vitro effects of <i>echinacea sp</i> and ginseng on natural killer and anti-body-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or AIDS patients. Immunopharmacology. Jan 1997; 35(3): 229-35	Penelitian in vitro, dimana ekstrak <i>echinacea sp</i> secara nyata akan meningkatkan fungsi imun yang imunitas selulernya tertekan seperti pada AIDS.
Bratman S, Kroll D. <sup>17</sup>	Natural Health Bible. Prima Publishing. 1999: 179-81.	Penelitian klinis <i>double blind</i> terhadap 120 orang <i>common cold</i> yang mendapat <i>echinacea sp</i> dibanding plasebo didapatkan perbaikan klinisnya lebih cepat pada kelompok yang mendapatkan <i>echinacea sp</i> .

---

Currier NL, Miller SC. <sup>18</sup>	Natural Killer cells from aging mice treated with extracts from <i>echinacea sp purpurea</i> are quantitatively and functionally rejuvenated. <i>Exp Gerontol.</i> 2000 Aug;35(5): 627-39	<i>E. purpurea</i> dengan komponen-komponen fitokimianya dapat merangsang sekresi sel-sel NK demikian juga fungsi sitolitiknya pada binatang coba (mencit) yang mengalami penuaan.
---	---	--

---

Goel V, Chang C, Slama J, Barton R, Bauer R, Gahler R, Basu T. <sup>19</sup>	<i>Echinacea sp</i> stimulates macrophage function in lung and spleen of normal rats. <i>J Nutr Biochem.</i> 2002;13(8):487	<i>Echinacea purpurea</i> lebih meningkatkan sistem imunologis subset CD <sup>4+</sup> dan CD <sup>8+</sup> dibanding sel-sel <i>T helper</i> dan sel <i>T supresor</i> sebagaimana hasil penelitiannya dan ini menunjukkan adanya peningkatan respon imunitas seluler pd tikus normal.
--	---	---

---

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Kanker Payudara

##### 2.1.1 Anatomi dan Histologi

Payudara terdiri atas struktur glandular dan lemak yang telah mengalami modifikasi dan terspesialisasi yang terletak pada fascia superfisial dari dinding dada. Pada wanita dewasa berada pada celah iga depan ke dua sampai ke tujuh, mulai dari tepi lateral sternum sampai dengan linea aksilaris media. Pada bagian lateral berbatasan dengan aksila dan fascia M. Seratus anterior dan pada bagian inferior dengan M. Obliquus eksternus dan M. Rektus abdominis. Masing-masing payudara berbentuk menyerupai piramidal dengan apeks menuju ke puting payudara, dan terfiksasi dengan jaringan ikat, ligamentum suspensarium yang meluas dari jaringan interlobular sampai dermis<sup>20</sup>.

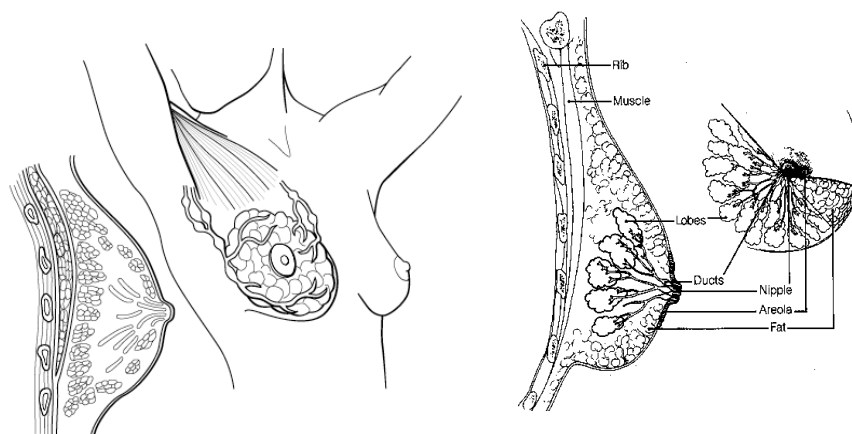
Payudara terdiri dari tiga lapisan yaitu

1. Lapisan subkutaneum terdiri dari kulit, jaringan adiposa dan jaringan ikat luar
2. Lapisan kedua terdiri dari kelenjar, duktus dan jaringan ikat fibrosa
3. Lapisan retromammaria terdiri dari lemak dibelakang payudara, otot dan jaringan ikat dalam<sup>20</sup>.

Ukuran payudara dari kepala-ekor antara 10 -12 cm, dan ketebalan kelenjar maksimum 3 – 5 cm. Aksis panjang dari payudara berjalan menuju aksila, dan bagian yang menuju aksila disebut *axillary tail* atau *tail of Spence*. 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 dengan jumlah duktus dan lobulus yang bervariasi 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<sup>20,21</sup>.

Secara histologis puting dan areola tersusun atas lapisan keratin dan mengandung kelenjar pilosebaceus. Pada muara dari saluran laktiferus dilapisi oleh epitel squamous yang kemudian akan membentuk squamo-kolumnar pada bagian distal dari sinus laktiferus. Baik puting dan saluran laktiferus dilingkupi oleh otot polos yang tertanam dalam stroma kolagen. Sedangkan pada lobulus susunan histologisnya berubah-ubah karena berhubungan dengan fluktuasi hormon (siklus menstruasi, kehamilan, laktasi dan menopause)<sup>20,21</sup>.



**Gambar 1.** Anatomi kelenjar payudara<sup>20</sup>  
(Diambil dari : Martini F. Fundamental of anatomy and physiology. New Jersey: Prentice Hall, 1989)

### 2.1.2. Insidens dan Epidemiologi

Kanker payudara merupakan keganasan yang banyak diderita wanita saat ini. Di Amerika pada tahun 1993, angka kejadian kanker adalah 28 per 100.000 populasi. Singapura pada tahun 1990, kanker payudara merupakan urutan teratas dari seluruh keganasan pada wanita dengan insidens 500 kasus baru dan diperkirakan menjadi 1.000 kasus baru pada tahun 2000.<sup>22</sup> Di India pada tahun 1990, kanker payudara menduduki urutan kedua dengan frekuensi 15,81% dari seluruh keganasan pada wanita atau 14,15 per 100.000 populasi.<sup>23</sup> Data Badan Registrasi Kanker Ikatan Ahli Patologi Indonesia (BRK-IAPI) 1994 memperlihatkan bahwa frekwensi kanker payudara pada wanita di Indonesia (12,60%) menduduki urutan kedua tertinggi setelah kanker rahim (18,86%). Sejumlah kejadian kanker payudara di kota-kota besar di Indonesia: Palembang:17,8%, Surakarta:17,7%, Padang:25,8%, Denpasar:19,2%, Jakarta 18,2%, Malang:17,7%, Bandung:20%, Surabaya:17,2%, Semarang:17,1%, Makasar:27,9%, Yogyakarta:26,6%, dan Manado:15,1%.<sup>24</sup>

Kanker payudara paling banyak terdiagnosa pada kelompok usia 55-64 tahun, tetapi pada penelitian di Semarang menunjukkan angka yang berbeda dimana insiden semakin meningkat sesuai dengan bertambahnya umur. Secara Histopatologi kasus yang tertinggi adalah tipe karsinoma duktus infiltratif (88,3%).<sup>24</sup>

### 2.1.3 Etiologi dan Patogenesis

Etiologi kanker payudara sampai saat ini belum diketahui secara pasti. Penyebab terjadinya kanker payudara bersifat multifaktorial yang terkait satu dengan yang lain. Beberapa faktor yang diperkirakan mempunyai pengaruh besar dalam terjadinya kanker payudara adalah riwayat keluarga (faktor genetik), hormonal dan faktor lain yang bersifat eksogen.<sup>25</sup>

Proto-onkogen yang berperan pada terjadinya kanker payudara adalah C-erb-B2 (neu) yang merupakan reseptor faktor pertumbuhan, dimana oleh karena berbagai sebab yang tidak diketahui akan mengalami amplifikasi dimana pita dari suatu kromosom akan mengalami penggandaan. Bila daerah yang tergandakan tersebut merupakan lokasi dari suatu proto-onkogen ( misalnya C-erb B2 ), maka proto-onkogen tersebut akan ikut tergandakan sehingga terjadi ekspresi yang berlebihan. Kanker payudara dapat terjadi bila suatu anti-onkogen yang berfungsi untuk memperbaiki suatu kerusakan DNA, karena suatu mutasi kehilangan fungsinya, maka mutasi gen lain menjadi tak dapat dicegah, termasuk mutasi pada gen-gen penyebab kanker<sup>26</sup>.

Pada kanker payudara anti-onkogen yang berperan adalah BRCA-1 (pada kromosom 17) dan BRCA-2 (pada kromosom 13) (BRCA= *breast cancer*). Juga pada keadaan mutasi homozigot pada gen p53, apoptosis tak dapat terjadi dan mutasi tak dapat dicegah. Dalam hal ini gen p53 dengan peran gandanya berfungsi sebagai anti-onkogen yaitu mencegah replikasi sel dengan cara menahan sel tetap berada pada fase G1 (atau G2) dan memicu apoptosis untuk mengeliminasi sel yang mengandung DNA yang rusak. Hilangnya p53 atau mutasi p53 akan

menyebabkan hilangnya kendali *chek point* ini, sehingga sel-sel dengan kerusakan DNA lolos masuk ke fase S dengan segala akibatnya. Autoantibodi dari p53 telah ditemukan di dalam serum penderita kanker payudara<sup>26,27</sup>.

Berbagai faktor resiko berperan penting pada timbulnya kanker payudara.

1. Faktor Usia

Terjadi peningkatan dari 1:5900 menjadi 1:290 untuk terjadinya kanker payudara antara usia dekade tiga dan delapan. Wanita pada usia sekitar 60-79 tahun memiliki resiko 1:14 untuk terjadinya kanker payudara invasif dibandingkan dengan usia kurang dari 39 tahun (1:225)

2. Faktor mutasi genetik

Kurang lebih 5-10% dari kanker payudara berhubungan dengan faktor keturunan. Dua gen autosomal dominan, yaitu BRCA1 dan BRCA2 dihubungkan dengan terjadinya kanker payudara dalam suatu keluarga atau keturunan. Mutasi gen tersebut dalam suatu keluarga menyebabkan 60-80% resiko terkena kanker payudara.

3. Faktor Hormonal

Beberapa faktor yang berhubungan dengan estrogen endogen, seperti usia menarche, menopause, riwayat melahirkan anak pertama dan pemberian terapi pengganti hormon meningkatkan resiko kejadian 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. Estrogen dan progestin menyebabkan pertumbuhan dan proliferasi dari sel-sel payudara melalui *growth factor* seperti *transforming growth factor (TGF)-alpha*.

Pengaruh hormon ovarium terhadap perkembangan kanker payudara pada suatu penelitian setelah ablasi ovarium, didapatkan penurunan hingga 75% untuk terkena kanker payudara. Beberapa penelitian juga menyebutkan bahwa estrogen endogen dan androgen ditemukan lebih tinggi pada wanita yang menderita kanker payudara.

#### 4. Faktor Lingkungan dan gaya hidup

Beberapa faktor lingkungan dan gaya hidup seperti : alkoholisme, diet tinggi lemak, perokok, perokok pasif dan riwayat radiasi ionisasi pada dada meningkatkan resiko terkena kanker payudara. Hal tersebut mungkin mempengaruhi onkogen dan gen supresi tumor dari kanker payudara<sup>25,28,29</sup>.

### 2.1.4 Klasifikasi

WHO membuat klasifikasi kanker payudara berdasarkan gambaran histologisnya baik lesi jinak maupun ganas, termasuk papiloma intraduktus, adenoma, karsinoma *in-situ* (duktus dan lobulus), karsinoma invasif (duktus dan lobulus) dan *Paget's disease of the nipple*. Tumor Phyllodes, baik jinak maupun ganas, dan karsinosarkoma merupakan lesi yang jarang, dan merupakan campuran

dari epitel dan jaringan ikat. Jenis lainnya adalah angiosarkoma dan limfoma<sup>30,31,32</sup>.

#### a. Kanker Payudara Non Invasif

Definisi dari kanker payudara non invasif adalah proliferasi dari sel epitel neoplastik yang terbatas pada duktus maupun lobulus dari kelenjar payudara tanpa adanya bukti invasi yang menembus membran basalis.

##### 1. Karsinoma intraduktus non invasif

Karsinoma intraduktus adalah karsinoma yang mengenai duktus disertai infiltrasi jaringan stroma sekitar. Terdapat 5 sub tipe dari karsinoma intraduktus yang dibagi berdasarkan gambaran arsitektur dan gambaran inti sel, yaitu: komedokarsinoma, solid, kribriiformis, papiler, dan mikrokapiler.

##### 2. Karsinoma lobular in situ

Karakteristik dari karsinoma lobular in situ adalah adanya proliferasi intraepitelial sel neoplastik pada bagian terminal dari unit lobulus. Sel-sel tampak membesar dan pucat, namun arsitektur dari lobulus masih tampak normal. Beberapa penelitian menyebutkan tentang sifat multifokal dan multisentrik pada karsinoma lobular in situ, dimana 50-90% terjadi juga pada payudara kontralateralnya.

#### b. Kanker Payudara Invasif

##### 1. Karsinoma duktus invasif

Karsinoma jenis ini merupakan bentuk paling umum dari kanker payudara. Karsinoma duktus invasif merupakan 65-80% dari karsinoma payudara. Metastase sering terjadi, terutama pada kelenjar limfe aksilaris, sedangkan metastase jauh terjadi pada tulang, paru-paru, hati dan otak.

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 otherwise specified (NOS)*, *scirrhous carcinoma*, *infiltrating carcinoma*, atau *carcinoma simplex*.

Karsinoma duktus invasif memiliki prognosis yang lebih buruk dibandingkan dengan jenis sub tipe yang lain.

## 2. Karsinoma lobular invasif

Karsinoma lobular invasif terjadi sekitar 5-10% dari seluruh kanker payudara invasif. Sering metastase pada kelenjar limfe aksila dan tempat-tempat yang tidak biasa, seperti meningen.

Merupakan karsinoma infiltratif yang tersusun atas sel-sel berukuran kecil dan seragam dengan sedikit pleimorfisme.

Karsinoma lobular invasive biasanya memiliki tingkat mitosis rendah.

### 3. Karsinoma musinosum

Disebut juga karsinoma koloid, dimana terjadi sekitar 3% dari seluruh kanker payudara invasif.

Didapatkan sejumlah besar mucus *intra* dan ekstraseluler yang dapat dilihat secara makroskopis maupun mikroskopis.

Karsinoma musinosum cenderung tumbuh lambat dan memiliki prognosis yang relatif baik.

### 4. Karsinoma meduler

Terjadi sekitar 5-7% dari seluruh kanker payudara invasif.

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.

### 5. Karsinoma papiler invasif

Komponen invasif dari jenis karsinoma ini berbentuk papiler.

### 6. Karsinoma tubuler

Diagnosis dari karsinoma tubuler bila pada gambaran histopatologisnya memberikan gambaran minimal 75% formasi tubuler. Pada karsinoma tubuler, bentuk sel teratur dan tersusun secara tubuler selapis, dikelilingi oleh stroma fibrous.

Prognosisnya lebih baik dibanding karsinoma duktus invasive.

### 7. Karsinoma adenokistik

Jenis ini merupakan karsinoma invasif dengan karakteristik sel yang berbentuk kribriiformis.

#### 8. Karsinoma apokrin

Karsinoma ini didominasi dengan sel yang memiliki sitoplasma eosinofilik, sehingga menyerupai sel apokrin yang mengalami metaplasia<sup>30,31,32</sup>.

### 2.1.5 Stadium klinik kanker payudara

Pengelolaan penderita sangat tergantung pada stadium klinik. Klasifikasi kanker payudara adalah berdasarkan *International Classification of Staging* atau berdasarkan klasifikasi TNM (*Tumour, Node, Metastasis*) *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* atau *International Union Against Cancer (UICC)*<sup>31,33</sup>

Apabila pada penderita karsinoma primer telah ditemukan penyebaran metastasis ke kelenjar limfe aksilaris, kemungkinan hidup 5 tahun dan 10 tahun lebih rendah bila dibandingkan pada penderita tanpa metastasis. Penderita dengan metastasis jauh mempunyai prognosis yang lebih buruk<sup>33</sup>.

*American Joint Committee on Cancer (AJCC)* membuat sistim *staging* untuk mengelompokkan penderita kanker payudara berdasarkan prognosanya. Keputusan terapi diformulasikan dengan mempertimbangkan katagori- katagori tersebut, terutama adalah ukuran tumor status limfonodi, tingkat reseptor estrogen dan progesteron pada jaringan tumor, status menopause dan keadaan umum kesehatan pasien. *Staging* dari AJCC didisain berdasarkan klasifikasi TNM<sup>30,31,33</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 infraklavikuler 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

**Tabel 2.** Sistem *staging* kanker payudara

<b>Stadium Luasnya Penyebaran</b>	
Stadium I	Benjolan disertai sedikit kerutan ke kulit, tetapi tidak ditemukan pembesaran nodus
Stadium II	Benjolan dengan metastase ke kelenjar limfe atau terdapat kerutan kulit
Stadium III	Tumor secara ekstensif melekat pada kulit atau dan jaringan otot dibawahnya atau ulserasi atau kelenjar limfe yang terfiksasi
Stadium IV	Metastasis jauh

Berdasarkan dari derajat histologinya, adenokarsinoma payudara menurut "*Nottingham Modification of The Bloom- Richardson System*"<sup>34</sup>.

**Tabel 3.** Derajat histologis

<b>Skor</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Formasi tubuler</b>	Terdapat formasi Tubuler > 75 %	Terdapat formasi Tubuler 10 –75 %	Terdapat formasi Tubuler < 10 %
<b>Inti pleimorfik</b>	Terdapat variasi Minimal dari bentuk ukuran inti	Terdapat variasi moderat dan bentuk ukuran Inti	Terdapat variasi yang nyata dari bentuk dan ukuran Inti
<b>Jumlah mitosis</b>	0-5	6-10	>11

## **2.2 Respon Immunologik Terhadap Sel Tumor**

### **2.2.1 Respon Immunologik Terhadap Sel Tumor**

Respon imun merupakan hasil interaksi antara antigen dengan sel-sel imunokompeten, termasuk mediator-mediator yang dihasilkannya. Limfosit merupakan unit dasar terbentuknya respon imun karena mampu berdiferensiasi menjadi seri lainnya, juga karena berperan dalam mengenal sekaligus bereaksi dengan antigen.<sup>8,35</sup> Limfosit T dapat bertindak sebagai efektor dalam respon imun, tetapi dapat pula bertindak sebagai regulator respon imun karena kemampuannya dalam mempengaruhi aktivitas sel imunokompeten lainnya melalui limfokin yang dilepaskannya. Limfosit T-helper (Th) dan T-supresor (Ts) mempengaruhi produksi imunoglobulin oleh limfosit B. Setelah limfosit B berkontak dengan antigen kemudian berproliferasi, sebagian berdiferensiasi menjadi sel plasma yang berfungsi mensintesis serta mensekresi imunoglobulin, dan sebagian lagi menjadi limfosit B memori<sup>36,37</sup>.

Induksi limfosit T dalam respon imun hampir selalu bersifat makrofag “dependent”. Makrofag berfungsi untuk memproses imunogen dan menyajikannya ke limfosit T spesifik (immune- T cells).<sup>38</sup> Pada penelitian in vitro dapat terjadi ikatan limfosit T dengan makrofag. Ikatan limfosit T dengan makrofag sangat dipengaruhi oleh imunogen. Jumlah limfosit T yang terikat pada makrofag sangat meningkat secara nyata pada makrofag yang terlebih dahulu dipaparkan dengan imunogen yang dipakai untuk imunisasi.<sup>39</sup>

Respon Imun pada dasarnya terdiri dari tiga fase :

- a. Fase Kognitif

Fase kognitif dari respon imun terdiri dari pengikatan imunogen ke reseptor spesifik dari limfosit *mature* yang terjadi sebelum stimulasi imunogenik. Limfosit B memiliki molekul antibodi pada permukaannya yang dapat mengikat protein, polisakarida, atau lipid. Sedangkan limfosit T hanya mengenal peptida yang berikatan dengan MHC pada permukaan sel penyaji<sup>40</sup>. Respon imun diawali dengan peristiwa masuknya imunogen dan penyajian imunogen tersebut ke reseptor dari limfosit<sup>8,40</sup>.

b. Fase Aktivasi

Fase aktivasi dari respon imun merupakan rangkaian kejadian dimana limfosit terinduksi sebagai konsekuensi dari pengenalan terhadap imunogen spesifik. Limfosit mengalami dua perubahan utama dalam respons terhadap imunogen. Pertama, limfosit spesifik berproliferasi sehingga jumlahnya bertambah. Kedua, limfosit tersebut berdiferensiasi menjadi sel yang berfungsi mengeliminasi imunogen asing.<sup>8,41</sup> Interaksi makrofag yang menyajikan imunogen dengan limfosit T spesifik mengakibatkan makrofag mensekresikan IL-1 yang menstimulasi limfosit T helper sehingga menghasilkan IL-2. Limfosit T helper berproliferasi sebagai respons terhadap IL-2 tersebut. Limfosit T helper tersebut juga menghasilkan interleukin lain yang dapat menginduksi berbagai sel lain seperti limfosit B, makrofag, prekursor limfosit T sitotoksik, dan sel endothelial<sup>8,40,41</sup>.

c. Fase Efektor

Fase efektor dari respons imun adalah tahap pada waktu limfosit telah teraktifkan oleh Imunogen dan dalam keadaan yang dapat berfungsi

mengelminasi imunogen tersebut. Pada fase efektor, imunogen tidak lagi berperan kecuali sebagai suatu target untuk dihancurkan.<sup>8,40</sup>

Mekanisme dari interaksi limfosit T dengan limfosit B pada respons pembentukan antibodi terhadap imunogen menjadi jelas jika limfosit B cukup efisien berfungsi sebagai sel penyaji. Penelitian terdahulu tentang persyaratan yang dibutuhkan untuk produksi antibodi menunjukkan bahwa respons primer pembentukan antibodi terhadap sel darah merah domba in vitro tidak terjadi jika tidak terdapat makrofag dan sel dendritik. Hal ini menuntun ke hipotesis bahwa respons imun diinisiasi oleh pengenalan limfosit T helper terhadap imunogen yang disajikan oleh sel penyaji selain limfosit B. Pada individu yang pertama kali terpapar dengan imunogen, jumlah limfosit B spesifik masih sangat sedikit sehingga dibutuhkan sel penyaji yang lain. Limfosit B juga kurang efisien untuk memproses imunogen karena limfosit B memiliki lebih sedikit lisosim. Makrofag sangat berperan sebagai sel penyaji untuk induksi respon imun. Respon optimal pembentukan antibodi terhadap t-dependent antigen membutuhkan partisipasi dan interaksi dari minimal tiga tipe sel yaitu makrofag, limfosit T, dan limfosit B.<sup>40</sup>

Sebaran limfosit disekitar sel kanker secara histologik mempunyai nilai prognostik yang baik karena kecepatan pertumbuhan sel kanker akan menurun. Secara invitro, beberapa sel imun disekitar sel kanker terbukti dapat membunuh sel kanker disekelilingnya.<sup>8,42,43</sup> Hubungan antara banyaknya limfosit yang ditemukan diantara kelompok sel kanker secara histopatologi dengan prognosis penderita telah ditunjukkan pada kanker leher rahim.<sup>44</sup>

Sel imun yang berada disekitar sel kanker yang berperan dalam perondaan imun terhadap kanker adalah limfosit T sitotoksik (CTL), Sel NK (*Natural Killer*) dan makrofag . Setelah mengenal sel kanker sebagai sel asing, ketiga sel imun tersebut akan menghancurkan sel kanker. <sup>8,43,45</sup>

Sel CTL dan sel NK melakukan cara sitotoksitas yang sama yaitu dengan mengeluarkan perforin, sedangkan makrofag menggunakan cara fagositosis. <sup>8,43</sup> Setelah mengenal sel tumor dengan caranya masing-masing, CTL dan sel NK melepas granula azurofilik. <sup>8</sup> Granula CTL dan sel NK mengandung perforin, sitotoksin, serine esterase (granzyme) dan proteoglikan. Perforin akan menimbulkan lubang pada membran sel target (sel tumor) , dimana lubang tersebut merupakan pintu masuk bagi molekul sitotoksik lainnya dalam sitoplasma dan inti sel. Perforin dapat digunakan sebagai marker dari sel yang bersifat sitotoksik yaitu CTL dan sel NK. <sup>46</sup>

Dalam memproses antigen tumor in vivo akan melibatkan baik respon imun humoral maupun seluler. Sampai saat ini belum ada bukti antibodi secara sendiri dapat menghambat perkembangan / pertumbuhan sel tumor. Dengan demikian respon imun humoral dalam bentuk antibodi terhadap tumor selalu memerlukan bantuan efektor imun seluler . <sup>8,46</sup>

Komponen efektor pada sistem imun yang memiliki kemampuan bereaksi dengan sel tumor ialah limfosit T, *antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC), sel NK dan makrofag.

1. Limfosit T sebagai efektor anti tumor

Subpopulasi limfosit T, limfosit T-helper dan T- sitotoksik sama-sama berperan dalam mengeliminasi antigen tumor. Sel yang mengandung antigen tumor akan mengekspresikan antigennya bersama molekul MHC kelas I yang kemudian membentuk kompleks melalui TCR (*T-cell Receptor*) dari sel T- sitotoksik (CD8), mengaktivasi sel T-sitotoksik untuk menghancurkan sel tumor tersebut. Sebagian kecil dari sel tumor juga mengekspresikan antigen tumor bersama molekul MHC kelas II, sehingga dapat dikenali dan membentuk kompleks dengan limfosit T-helper (CD4) dan mengaktivasi sel T-helper terutama subset Th1 untuk mensekresi limfokin IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$  di mana keduanya akan merangsang sel tumor untuk lebih banyak lagi mengekspresikan molekul MHC kelas I, sehingga akan lebih mengoptimalkan sitotoksitas dari sel T-sitotoksik (CD8).<sup>8,47</sup> Konsep ini diaplikasikan dalam pengobatan tumor menggunakan TIL(*Tumor-infiltrating Lymphocytes*), yaitu sel-sel mononuklear yang berin filtrasi menuju ke sekitar jaringan tumor padat karena adanya reaksi inflamasi, sel tersebut diperbanyak secara kultur in vitro dengan penambahan IL-2.<sup>47</sup>

## 2. Antibodi yang diproduksi limfosit B berperan dalam sitotoksitas sel tumor

Selain limfosit B berperan dalam membentuk antibodi spesifik terhadap antigen tumor, juga berperan dalam mengikat, memproses dan mempresentasikan antigen tumor untuk menginduksi sel Th agar menghasilkan respon pada sel tumor. Fungsi yang terakhir disebutkan adalah kapasitas limfosit B sebagai *Antigen Presenting Cells* (APC).<sup>47</sup> Meskipun pada tumor, imunitas selular lebih banyak berperanan daripada imunitas humoral, tetapi tubuh

membentuk juga antibodi terhadap antigen tumor. Antibodi tersebut ternyata dapat menghancurkan sel tumor secara langsung atau dengan bantuan komplemen, atau melalui sel efektor ADCC yang memiliki reseptor Fc misalnya sel K dan makrofag (opsonisasi) atau dengan jalan mencegah adhesi sel tumor. Pada penderita kanker sering ditemukan kompleks imun, tetapi pada kebanyakan kanker sifatnya masih belum jelas<sup>8,46,47</sup>.

Antibodi diduga lebih berperan terhadap sel yang bebas (leukemia, metastase tumor) dibanding terhadap tumor yang padat, mungkin dengan membentuk kompleks imun dan dengan demikian mencegah sitotoksitas sel T<sup>8,47</sup>.

### 3. Sel Natural Killer sebagai efektor anti tumor

Sel NK merupakan komponen utama dari perondaan imun, yang dapat bekerja sebagai sel efektor dari imunitas natural maupun spesifik / adaptif. Mekanisme efektor sel NK mirip dengan sel T-sitotoksik (CD8), yang membedakan adalah bahwa sel NK melakukan sitotoksitas terhadap sel tumor tanpa melalui ekspresi antigen tumor bersama molekul MHC kelas I (*MHC-unrestricted manner*). Secara *in vitro*, sel NK dapat melisis sel terinfeksi virus dan cell line dari tumor terutama tumor hematopoetik. Sebagian dari populasi sel NK dapat melisis sel target yang diopsonisasi oleh antibodi, terutama dari kelas IgG karena sel NK memiliki reseptor FcγRIII atau CD16 untuk Fc dari IgG. Kapasitas tumorisidal dari sel NK akan ditingkatkan oleh berbagai sitokin, diantaranya IFN, TNF, IL-2 dan IL-12. Konsep ini diadaptasikan dalam imunoterapi tumor menggunakan LAK

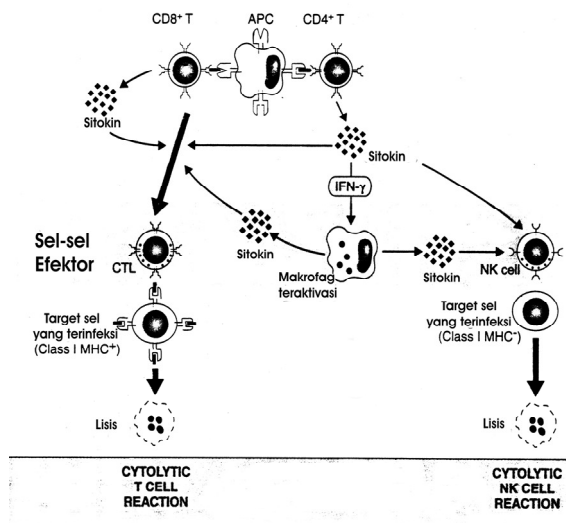
(*Lymphokine-activated Killer*), yaitu sel mononuklear perifer yang dikultursecara in vitro dengan penambahan IL-2 dosis tinggi.<sup>8,48</sup>

#### 4. Peran makrofag dalam respon antitumor.

Makrofag juga berperan dalam pertahanan melawan sel tumor baik bertindak sebagai APC dalam mengolah dan mempresentasikan antigen tumor kepada sel Th, maupun bertindak langsung sebagai efektor dengan melisis sel tumor.<sup>8,42,47</sup>

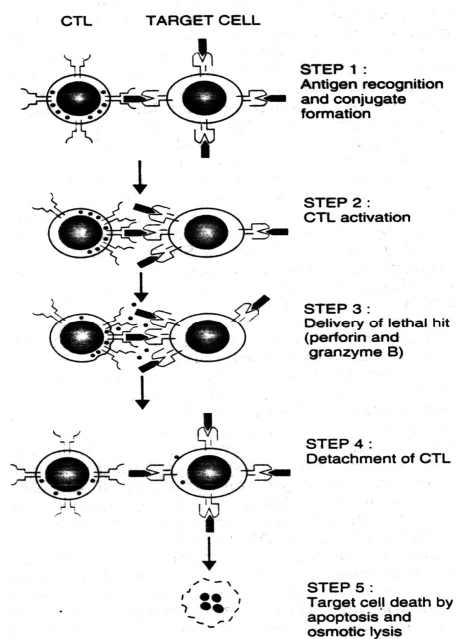
Makrofag yang berperan dalam mekanisme tersebut adalah makrofag aktif yaitu makrofag yang telah diaktifasi oleh MAF, suatu sitokin yang dihasilkan limfosit T yang distimulasi antigen. Makrofag yang tidak aktif telah dibuktikan tidak memiliki kemampuan melisis sel tumor.<sup>8,42,47</sup>

Seperti juga pada sel NK, mekanisme pengenalan sel tumor sasaran oleh makrofag juga belum jelas. Sedangkan kemampuan untuk berikatan dengan sel tumor terjadi karena sel makrofag juga memiliki reseptor Fc dari IgG, sehingga dapat bekerja sama dengan IgG dalam melisis sel tumor. Penyebab terjadinya lisis sel tumor disebabkan oleh pengaruh enzim lisosomal, metabolit yang reaktif terhadap oksigen dan NO. Makrofag aktif juga mensekresi sitokin yang dikenal dengan *Tumor Necrosis Factor* (TNF), TNF mampu melisis sel tumor melalui cara TNF berikatan dengan reseptor permukaan dari sel tumor dan secara langsung melisis sel tumor dan TNF dapat menyebabkan nekrosis dari sel tumor dengan cara memobilisasi berbagai respon imun tubuh<sup>8,42,47</sup>.



**Gambar 2.** Reaksi immune *T-Cell mediated*.<sup>8</sup>

(Dimodifikasi dari : Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: WB Saunders Co. 1997 : 279)



**Gambar 3.** Tahapan sitolitik sel target oleh CTLs.<sup>8</sup>

(Dimodifikasi dari : Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: WB Saunders Co. 1997 : 293).

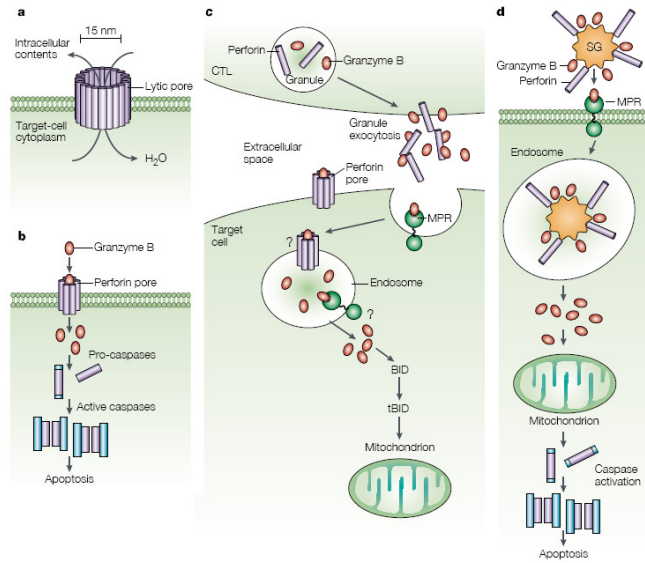
### 2.2.2 Peran Perforin pada respon imunologis

Perforin adalah suatu protein sitolitik yang ditemukan dalam granula-granula sel T-sitotoksik (CD-8) dan sel NK (*Natural killer*). Setelah terjadi degranulasi, perforin akan menempatkan pada target sel, dalam hal ini pada membran plasma sel kanker untuk membentuk lubang (pore). Adanya lubang pada membran sitoplasma akan menyebabkan instabilitas osmotik dan lisis dari sel target (sel kanker)<sup>46,48</sup>.

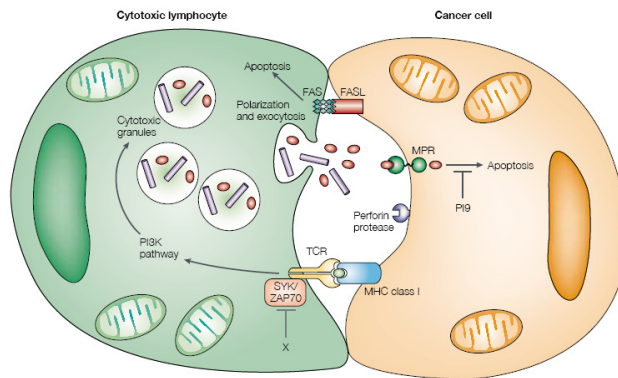
Adanya lubang pada membran sitoplasma juga menyebabkan granzyme, suatu protease serin eksogen yang juga terdapat dalam granula-granula sel T-sitotoksik dan sel NK akan masuk ke sitoplasma dan menginduksi apoptosis<sup>49,50</sup>.

Perforin dan atau granzyme memiliki peran yang sangat vital pada mekanisme *killling* dari sel yang terinfeksi atau sel kanker, walaupun mekanisme tersebut adalah merupakan satu bagian dari respon imunologis<sup>49,50</sup>.

Sel T-sitotoksik dan sel NK merupakan efektor yang berfungsi dalam sistem pertahanan tubuh untuk melawan infeksi virus, bakteri tertentu dan sel kanker. Keduanya mengeliminasi sel target dengan 2 cara. Yang pertama dengan memproduksi perforin dan granzyme yang bersama-sama akan menyebabkan apoptosis dari sel target. Jalur yang kedua dengan ikatan antara sel target dengan *target-cell death receptors*, seperti FAS (CD95), ataupun FAS Ligan (FASL)<sup>49,50</sup>.



**Gambar 4.** Peran perforin dalam mekanisme kematian (apoptosis) sel target.<sup>49</sup>  
 (Diambil dari : Functional Significance of the Perforin/Granzyme Cell Death Pathway, Vol 2, Oktober 2002: 738)

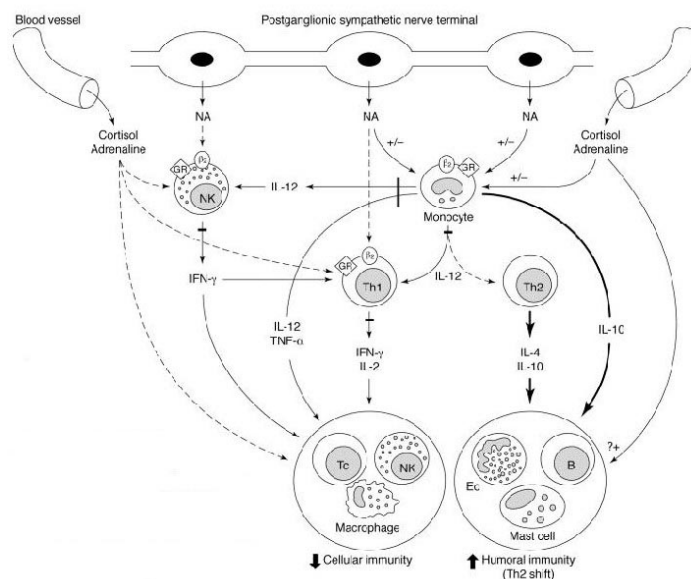


**Gambar 5.** Peran perforin dalam eliminasi sel kanker.<sup>49</sup>  
 (Diambil dari : Functional Significance of the Perforin/Granzyme Cell Death Pathway, Vol 2, Oktober 2002:744 )

### 2.3 Pengaruh stress terhadap respon imunologi

Stress dalam hubungannya dengan kehidupan memiliki arti suatu keadaan yang merupakan akibat uji atau ancaman terhadap kapasitas adaptif, sesuatu yang mengganggu keseimbangan dinamik atau homeostatik<sup>8,13</sup>.

Stres sangat berpengaruh terhadap imunitas tubuh melalui stimulasi sekresi kortisol dan adrenalin dari korteks dan medula adrenal. Juga berpengaruh terhadap pelepasan noradrenalin dari postganglion simpatik terminal saraf di pembuluh darah dan organ limfoid. Efek sistemik dari glukokortikoid dan katekolamin ini mempengaruhi pengaturan sitokin tipe 1 dan tipe 2. Stres akan menurunkan produksi sitokin tipe 1 yang dibutuhkan dalam menanggapi infeksi bakterial melalui respon imunitas seluler, seperti tampak dalam gambar 6.<sup>8,9,13</sup>



**Gambar 6.** Mekanisme yang terjadi pada stress dan sistem imun<sup>13</sup>

(Diambil dari : Elemkov IJ and Chrousos GP. Stress hormones, Th1/th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and susceptibility to disease. TEM 1999;10(9):359-68).

Sel T CD4<sup>+</sup> yang telah teraktivasi akan berdiferensiasi tergantung tipe stimulan terutama adalah sitokin yang dihasilkan pada saat pengenalan antigen. Sitokin terpenting yang dihasilkan sel Th1 pada fase efektor adalah IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  akan memacu aktivitas pembunuhan mikroba sel-sel fagosit dengan meningkatkan destruksi intrasel pada mikroba yang difagositosis. Jadi fungsi pokok efektor Th1 adalah sebagai pertahanan infeksi dimana proses fagositosis sangat diperlukan. Th1 juga mengeluarkan IL-2 yang berfungsi sebagai faktor pertumbuhan autokrin dan memacu proliferasi dan diferensiasi sel T CD8<sup>+</sup>. Jadi Th1 berfungsi sebagai pembantu (helper) untuk pertumbuhan sel limfosit T sitotoksik yang juga meningkatkan imunitas terhadap mikroba intrasel. Sel-sel Th1 memproduksi LT yang meningkatkan pengambilan dan aktivasi netrofil seperti tampak dalam gambar 7.<sup>8,9,37</sup>

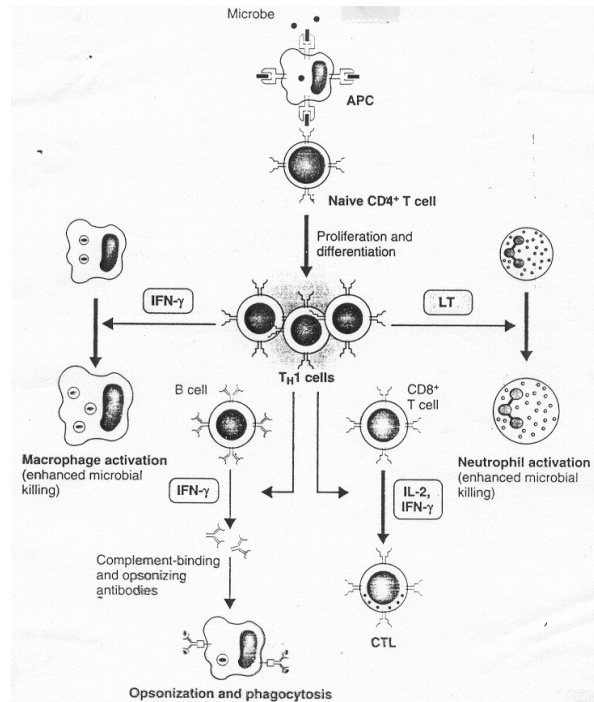
Karakteristik sitokin yang dihasilkan Th2 adalah IL-4 dan IL-5. Sehingga Th2 adalah mediator untuk reaksi alergi dan pertahanan infeksi terhadap cacing dan arthropoda. Th2 juga memproduksi sitokin seperti IL-4, IL-13 dan IL-10 yang bersifat antagonis terhadap IFN- $\gamma$  dan menekan aktivasi makrofag. Jadi Th2 kemungkinan berfungsi sebagai regulator fisiologis pada respon imun dengan menghambat efek yang mungkin membahayakan dari respon Th1. Pertumbuhan yang berlebihan dan tak terkontrol dari Th2 berhubungan dengan berkurangnya imunitas seluler terhadap infeksi mikroba intraseluler seperti mikobakteria seperti tampak pada gambar 8.<sup>8,9,37</sup>

Diferensiasi Sel T CD4<sup>+</sup> menjadi Th1 dan Th2 tergantung sitokin yang diproduksi pada saat merespon mikroba yang memacu reaksi imunitas.

Beberapa bakteri intaseluler seperti *Listeria* dan *Mycobakteria* dan beberapa parasit seperti *Leishmania* menginfeksi makrofag dan makrofag merespon dengan mengeluarkan IL-12. Mikroba lain mungkin memacu produksi IL-12 secara tidak langsung. Misalnya virus dan beberapa parasit memacu sel NK untuk memproduksi IFN- $\gamma$  yang memacu makrofag mengeluarkan IL-12. IL-12 berikatan dengan Sel T CD4<sup>+</sup> sehingga memacu untuk menjadi sel Th1. IL-12 juga meningkatkan produksi IFN- $\gamma$  dan aktivitas sitolitik yang dilakukan oleh sel T sitotoksik dan sel NK sehingga memacu imunitas seluler. IFN- $\gamma$  yang diproduksi Th1 akan menghambat proliferasi sel Th2 sehingga meningkatkan dominasi sel Th1<sup>8,9,37</sup>.

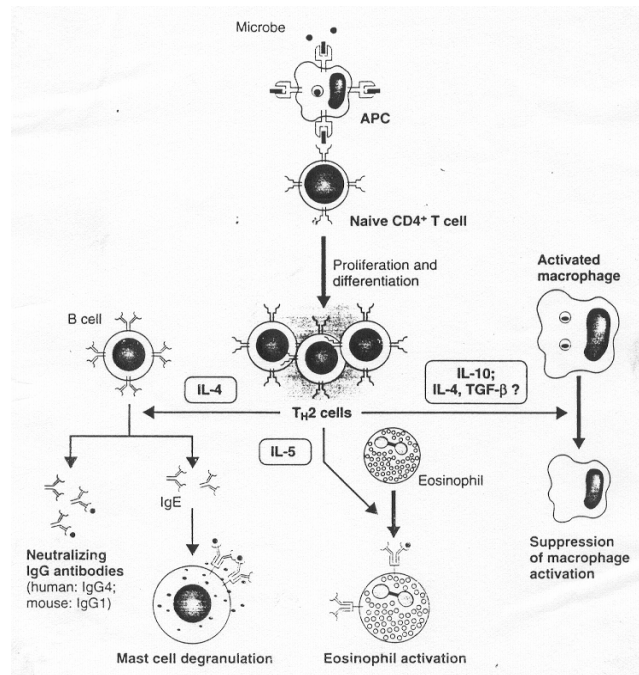
Diferensiasi Sel T CD4<sup>+</sup> menjadi Th2 dipacu oleh IL-4. Peranan IL-4 untuk memacu diferensiasi sel T CD4<sup>+</sup> menjadi Th2 menimbulkan pertanyaan, darimana datangnya IL-4 sebelum Th2 dipacu karena sel Th2 adalah sumber utama IL-4. Ternyata Sel T CD4<sup>+</sup> mengeluarkan IL-4 dalam jumlah kecil pada saat aktivasi inisial. Apabila antigen bersifat persisten dan berada dalam konsentrasi tinggi maka konsentrasi lokal IL-4 perlahan-lahan akan meningkat. Jika antigen tidak memicu inflamasi dengan mengeluarkan IL-12 maka hasilnya adalah peningkatan diferensiasi Sel T ke subset Th2 dan terjadi penumpukan efektor Th2. Jadi respon terhadap parasit cacing dan alergen lingkungan yang menyebabkan bergeser ke Th2 adalah stimulasi sel T yang persisten dan berulang-ulang dengan inflamasi yang kecil atau aktivasi makrofag. Keterangan lain yang diajukan adalah produksi IL-4 oleh tipe sel lain dan perbedaan struktur antigen

atau signal yang melingkapi APC selain sitokin. Faktor genetik juga mempengaruhi apakah akan bergeser ke Sel Th1 atau Th2<sup>8,9,37</sup>.



**Gambar 7.** Fungsi sel-sel Th1.<sup>8</sup>

(Diambil dari :Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: WB Saunders Co. 1997: 272)



**Gambar 8.** Fungsi sel-sel Th2.<sup>8</sup>

(Diambil dari :Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: WB Saunders Co. 1997: 273).

## 2.4 Echinacea Sebagai Immunostimulator

### 2.4.1 Sejarah dan penggunaan Echinacea

Echinacea berasal dari kata Yunani yaitu echinos, yang memiliki arti *hedgehog* atau landak (bulu landak) karena bentuk bunganya yang tajam-tajam. Nama umum lain yang sering dipakai adalah *Black Samson*, *Cock Up Hat*, *Comb Flower*, *Indian comb*, *Indian Head*, *Kansas Snakeroot*, *Kansas Coneflower*, *Purple Coneflower*, *Red Sunflower*, *Rudbeckia*, *Scurvy root*, *Snakeroot* dan *Sonnenhutkraut* (Jerman)<sup>51,52</sup>.

Tanaman Echinacea tumbuh terutama di Amerika utara, Kanada dan dibudidayakan secara komersial di Jerman sejak tahun 1930. Termasuk famili

*Asteraceae* atau *Composita*. Tinggi tanaman mencapai ukuran 10-60 cm, tahan kering dan tidak mudah patah namun pertumbuhannya lambat<sup>51</sup>.

Sebagai tanaman asli dari Amerika Utara, *Echinacea* telah banyak digunakan suku Indian untuk mengobati demam dan infeksi pernafasan, bahkan oleh beberapa kelompok suku digunakan untuk mengobati penyakit kelamin. Pasta yang dibuat dari seluruh tumbuhan *Echinacea* digunakan juga secara topikal untuk mengobati luka gigitan ular, sengatan serangga, luka bakar dan pembengkakan pada kelenjar. Akarnya dikunyah untuk pengobatan sariawan, sakit gigi dan radang tenggorokan<sup>51</sup>.

Sejak tahun 1800an, *E. Angustifolia* merupakan tanaman yang paling sering digunakan untuk pengobatan di Amerika Serikat. Sekitar tahun 1920an tanaman tersebut mulai dibudidayakan di Eropa. Bahkan permintaan akan tanaman tersebut di Eropa melebihi di Amerika Serikat<sup>51</sup>.

*Echinacea angustifolia* (*Narrow-leafed Purple Coneflower*), *E. pallida* (*Pale Purple Coneflower*) dan *E. purpurea* (*Purple Coneflower*) adalah tiga spesies yang paling sering digunakan di bidang pengobatan, namun ada enam spesies lain yang telah diidentifikasi. Sejak lama *E.angustifolia* diketahui mempunyai efek imunostimulasi yang besar tetapi sekarang tidak banyak digunakan. *E.purpurea* lebih mudah dibudidayakan secara komersial, sehingga merupakan spesies yang paling banyak digunakan saat ini<sup>51,52,53</sup>.

Kegunaan *Echinacea* adalah untuk terapi suportif *common cold*, infeksi traktus respiratorius kronik, pengobatan infeksi traktus urinarius bawah dan pengobatan luka superfisial bila diberikan secara eksternal. Pada percobaan

manusia dan hewan, sediaan diberikan secara oral atau parenteral untuk menghasilkan efek imunostimulasi. Diantara aksi-aksi fisiologik yang lain, jumlah sel-sel darah putih meningkat, fagositosis granulosit manusia meningkat dan peningkatan temperatur tubuh. Aktivitas lainnya bisa bersifat antiviral, antiinflamasi, antibakterial yang secara terus-menerus dilaporkan pada percobaan-percobaan invitro. Echinacea telah digunakan dengan aman selama berabad-abad. Echinacea dapat meningkatkan jumlah sel darah putih dan meningkatkan daya tahan tubuh, merangsang sel-sel *killer* dan menunjukkan aktivitas antiviral<sup>54,55</sup>.



**Gambar 9.** Echinacea purpurea.<sup>51</sup>

(Diambil dari : Echinacea (E. purpurea, E. angustifolia, E. pallida,  
[www.mcp.edu/herbal/default.htm](http://www.mcp.edu/herbal/default.htm))

#### **2.4.2. Biokimia dari Echinacea**

Bahan-bahan kimia yang dikandung oleh Echinace sp. antara lain

1. Karbohidrat : polisakarida (*arabinogalactan, xyloglycan, echinacin*),  
inulin

2. Glikosida : *caffeic acid* dan derivatnya (*chicoric acid, echinacoside*);  
*cynarin, a quinic acid*
3. Alkaloid : *isotussilagine, tussilagine*
4. Alkilamid : *echinacein*
5. Isobutilamid : *pentadecadienes, hexadecadienes*
6. Poliasetilen; *germacrene sesquiterpene*
7. Lain-lain : asam lemak, minyak esensial (*humulene, caryophyllene*),  
phytosterol

Beberapa spesies dari Echinacea mengandung beberapa bahan kimia lain. Sampai saat ini belum ada konsensus yang secara meyakinkan bahan mana yang merupakan bahan aktif immunomodulator<sup>51,52,55</sup>.

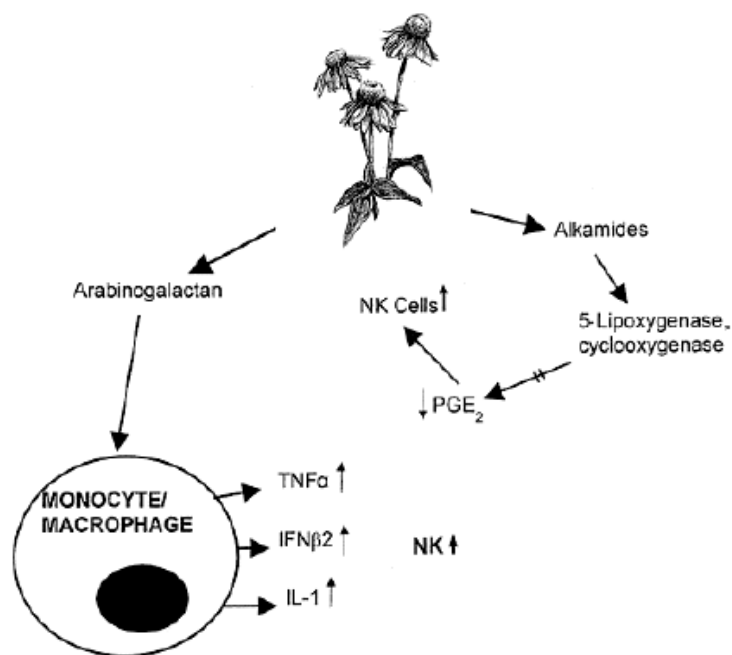
Beberapa pakar mempercayai bahwa polisakarida adalah bahan primer yang mempengaruhi sistem imunologi. *Arabinogalactan* adalah salah satu polisakarida dengan berat 75.000 dalton dimana bahan tersebut dapat memacu produksi sitokin tertentu (TNF- $\alpha$ , IL-1, Interferon- $\beta$ ), makrofag dan memiliki sifat toksis pada pertumbuhan beberapa jenis tumor, *Leishmania* (parasit intraseluler) dan *Candida albicans*. Terdapat sedikit efek peningkatan pada Limfosit B, namun tidak ditemukan efek langsung pada Limfosit T<sup>56,57</sup>.

*Echinacin* memiliki efek pada penyembuhan luka, terutama efek hambatan terhadap enzim hialuronidase dan stimulasi pertumbuhan dari fibroblast<sup>57</sup>.

Beberapa bahan pada Echinacea akan menstimulasi sel NK, sedangkan bahan lainnya (alkilamid) akan menghambat produksi prostaglandin yang

merupakan supresor terhadap sel NK. Sel NK sendiri merupakan pertahanan lini pertama terhadap timbulnya kanker.

Beberapa bahan lain memiliki efek yang bermacam-macam, seperti *isobutylamides* yang memiliki efek penghambatan terhadap asam arakidonat pada reaksi inflamasi<sup>51,52</sup>.



**Gambar 10.** Pengaruh Echinacea terhadap makrofag.<sup>59</sup>

(Diambil dari : Echinacea : Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of Echinacea purpurea. J Natl Cancer Inst. 1989; 81: 669-75)

### 2.4.3 Echinacea sebagai Immunostimulator

Penelitian-penelitian terdahulu menunjukkan bahwa Echinacea dapat meningkatkan produksi antibodi, jumlah dan aktivitas sel-sel darah putih sehingga

dapat disimpulkan hal-hal inilah yang meningkatkan sistem kekebalan untuk mencegah sakit<sup>56,57,58,59,60,61</sup>.

Pada data *in vitro* dari beberapa penelitian menyebutkan bahwa Echinacea memacu proliferasi dari sumsum tulang, fagositosis dan motilitas dari makrofag, peningkatan sel *polymorphonuclear* (PMN). E. Purpurea akan memacu makrofag untuk memproduksi TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 dan IL-10, peningkatan motilitas lekosit serta aktivasi limfosit T secara non-spesifik. Bila ekstrak E. Purpurea ditambahkan pada darah normal, AIDS dan CFS (*Chronic Fatigue Stress*), terdapat perbedaan yang signifikan pada antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) dan sel NK (*Natural killer cell*). Bahkan pada salah satu buku yang berjudul "*The AIDS Fighters*" menyebutkan bahwa Echinacea mungkin dapat membantu meningkatkan sistem kekebalan tubuh yang menurun pada penderita AIDS<sup>62</sup>.

Sedangkan beberapa penelitian pada hewan (tikus) menyebutkan bahwa Echinacea akan meningkatkan fagositosis oleh makrofag maupun netrofil. Efek paling tinggi di capai oleh spesies E. Purpurea (tiga kali lipat), sedangkan E. Pallida dan E. Angustifolia terjadi peningkatan dua kali lipat<sup>51</sup>.

Pada tikus yang dilakukan imunosupresi, pemberian Echinacea profilaksis dapat menurunkan infeksi oleh *Candida albicans* sampai 80% dibanding kontrol. Juga pada dosis letal dari infeksi *Listeria monocytogenes*, pemberian Echinacea akan menurunkan jumlah bakteri baik pada hati maupun limpa sebesar 95%. Yang selanjutnya pada hari ke 4 dan 6 setelah infeksi, semua tikus kontrol mati, sedangkan tikus yang mendapat Echinacea 68% tetap hidup<sup>51</sup>.

Pada tahun 1994 dari seluruh 26 penelitian klinis pada manusia disimpulkan bahwa Echinacea merupakan immunomodulator yang efektif. Studi di Eropa menyebutkan bahwa suntikan 5 mg dari E. Purpurea akan meningkatkan adesi dan kemotaksis dari sel PMN maupun monosit serta meningkatkan level serum CRP<sup>51</sup>.

Echinacea yang diberikan selama 10 hari sesaat orang mengalami gejala *common cold* dapat mengurangi gejala-gejala simptomatis yang dialami. Dalam penelitian *double blind* terhadap 120 orang yang mendapat Echinacea dibanding plasebo didapatkan bahwa hanya 40% yang menjadi *common cold* pada kelompok yang mendapat Echinacea, sementara 60% yang mendapat plasebo benar-benar mengalami sakit. Yang menarik dalam penelitian ini bahwa mereka yang benar-benar menjadi sakit, perbaikan klinisnya lebih cepat pada kelompok yang mendapatkan Echinacea<sup>17</sup>.

Pada suatu penelitian untuk mengetahui jumlah produksi sel NK di lien dan sumsum tulang pada mencit tua normal yang mendapatkan diet *Echinacea purpurea* selama 14 hari dibandingkan dengan yang mendapat suntikan tiroksin sebagai stimulator sel NK (10 hari). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pembentukan sel-sel NK meningkat pada kelompok Echinacea yang menunjukkan adanya pembentukan sel-sel NK baru di sumsum tulang, hal ini akhirnya meningkatkan jumlah absolut sel-sel NK di lien. Peningkatan jumlah sel-sel NK ini paralel dengan peningkatan kapasitas antitumor dan fungsi litik<sup>18</sup>.

Para peneliti Jerman (suatu *RCT double blind*) meneliti 238 kasus *common cold*. Pasien –pasien diberi Echinacea atau plasebo selama 7 sampai 9 hari dan

ditanya beratnya gejala *common cold* menggunakan skala yang berjumlah 10. Dokter juga memeriksa pasien di hari ke-4 dan ke-8. Pasien-pasien yang menderita sakit dalam skala sedang pada awalnya menunjukkan perbaikan sebesar 55% pada kelompok yang mendapat Echinacea dibandingkan 27% pada kelompok plasebo. Pasien yang mendapat terapi lebih awal akan menunjukkan perbaikan yang lebih cepat, pada umumnya pada hari ke-2, dilanjutkan sampai akhir pengobatan. Semua perbaikan terlihat pada 3 hari pertama pada kelompok yang mendapat Echinacea dan tidak ada efek serius yang dilaporkan<sup>19</sup>.

#### **2.4.4 Keamanan dan toksisitas dari Echinacea**

Pernah dilaporkan reaksi alergi terhadap Echinacea. Dimana dari 1032 subyek yang di teliti dengan tes tempel (*Patch test*) didapatkan 2 subyek yang menunjukkan reaksi alergi terhadap *E. Angustifolia*<sup>50</sup>.

Dari berbagai bahan yang terkandung dalam Echinacea, tidak ditemukan efek toksik terhadap manusia. Dari 2,5 juta peresepan Echinacea di Jerman dan Amerika tidak ditemukan efek samping yang berarti, kecuali reaksi alergi yang ringan yang sangat jarang<sup>51</sup>.

Pada reaksi toksik yang akut pernah dilaporkan hanya pada pemberian parenteral, sedangkan pemberian secara oral tidak pernah terjadi. Beberapa gejala yang terjadi pada pemberian parenteral antara lain : menggigil, demam dan kelemahan otot. Rasa tidak enak dan gangguan pengecap pada lidah juga pernah dilaporkan<sup>51</sup>.

Penelitian secara in-vitro pada *E. Purpurea* dan secara in-vivo terhadap tikus, pemberian secara terus menerus selama 4 minggu tidak memberikan efek

toksik, bahkan bila dosis yang diberikan melebihi dosis yang dianjurkan. Namun dari *German Commission Guideline* merekomendasikan bahwa pemberian Echinacea tidak melebihi 8 minggu, karena ada kemungkinan hepatotoksik atau immunosupresi serta manfaat dan keuntungan pada immunostimulasi. Efek stimulasinya mungkin akan berubah bila digunakan berkepanjangan, seharusnya jangan digunakan secara terus-menerus selama 8 minggu. Setelah penghentian obat, bisa diberikan lagi untuk pengobatan 8 minggu berikutnya<sup>50,51</sup>.

Interaksi dengan obat atau obat herbal lainnya hanya sedikit diketahui. Namun secara teoritis dapat mempengaruhi obat-obat immunosupresif, berdasarkan atas efek immunomodulator dari Echinacea. Juga pada pemberian bersamaan dengan obat-obat yang hepatotoksik sebaiknya dihindari<sup>50,51</sup>.

Pada penelitian terhadap 206 wanita hamil yang mengkonsumsi Echinacea selama masa hamil dan 112 diantaranya mengkonsumsi pada trimester pertama menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan terhadap bayi-bayi yang dilahirkan dalam hal kelainan kongenital. Penelitian prospektif ini menyimpulkan bahwa Echinacea aman digunakan pada ibu hamil dan penggunaan Echinacea pada saat organogenesis tidak berhubungan dengan meningkatnya resiko malformasi mayor<sup>50,63</sup>.

#### **2.4.5 Dosis dan cara pemberian**

Tidak ada dosis yang telah distandarisasi karena preparat echinacea terdiri dari bermacam-macam bentuk sehingga dosisnya juga bervariasi. Ekstrak dari E. Purpurea dalam alkohol tinktur paling banyak digunakan, karena beberapa

kandungan tidak larut dalam air. Dosis untuk berbagai jenis sediaan tersebut adalah :

Akar kering= 0.5 – 1.0 gram diberikan 3X sehari

Tincture (1:5) =  $\frac{1}{2}$  - 1 sendok teh diberikan 3X sehari

Ekstrak bubuk kering (standarisasi 3.5% echinacoside)

= 300 mg diberikan 3X sehari

Ekstrak cair (1:1 dalam 45% alkohol)

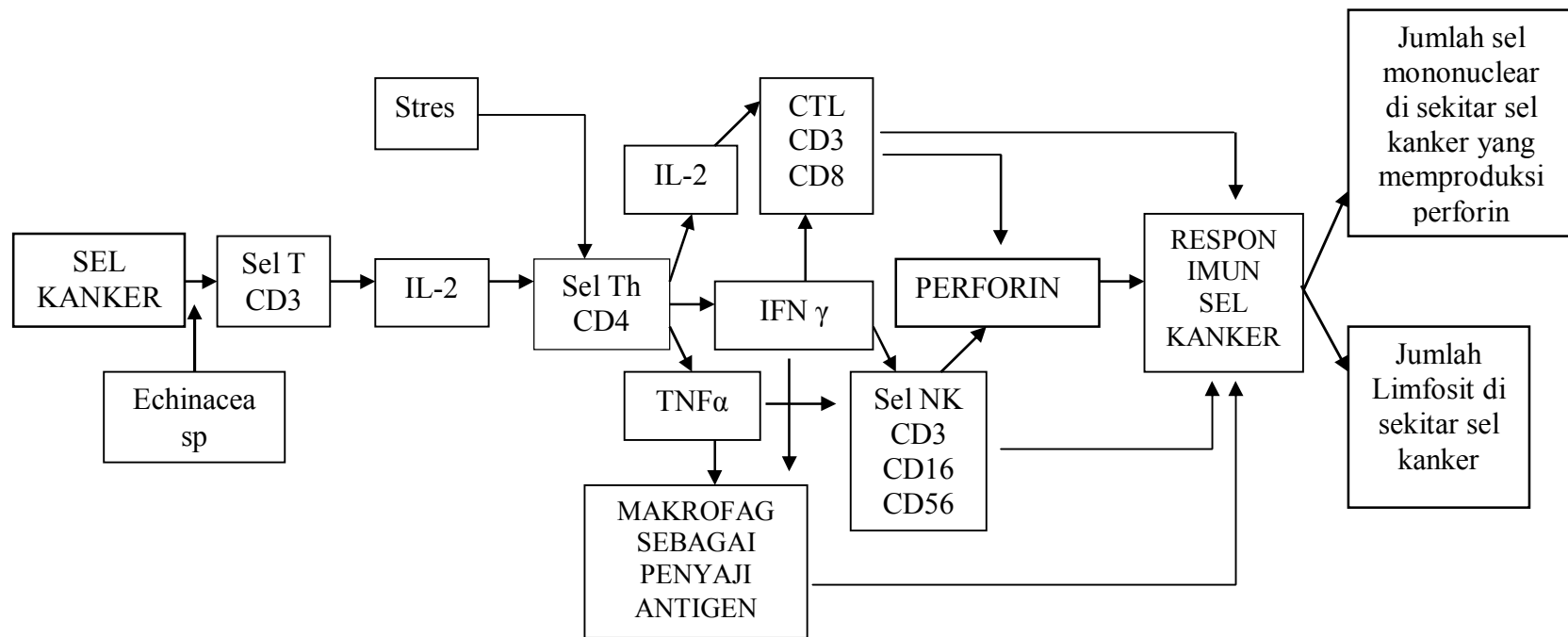
=  $\frac{1}{4}$  sampai  $\frac{1}{2}$  sendok teh diberikan 3X sehari

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

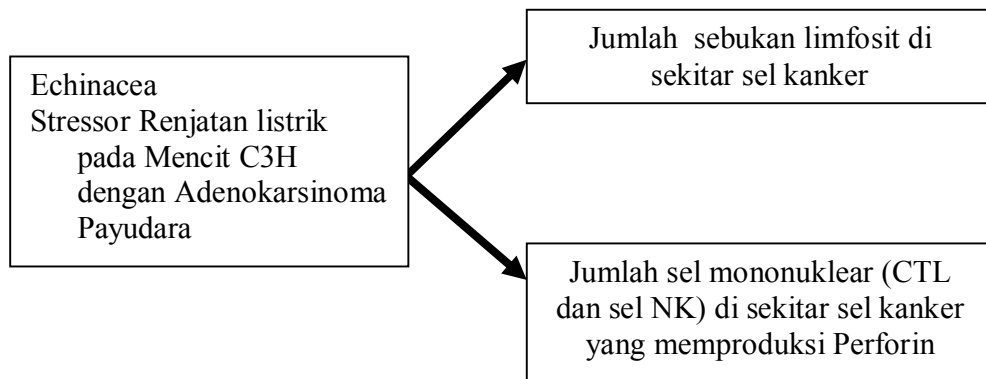
Injeksi = tidak tersedia di Amerika, namun sering digunakan di Jerman<sup>51,64</sup>.

**BAB III**  
**KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS**

**3.1 KERANGKA TEORI**



### 3.2. KERANGKA KONSEP



### 3.3 HIPOTESIS

1. Sebukan limfosit disekitar sel kanker payudara mencit C3H yang diberi stress dan mendapat Echinacea lebih tinggi dibanding yang tidak.
2. Jumlah sel mononuklear (sel NK dan CTL) yang memsekresi perforin disekitar sel kanker payudara mencit C3H yang diberi stress dan mendapat Echinacea lebih tinggi dibanding yang tidak

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Ruang lingkup penelitian

Ruang lingkup penelitian ini adalah Ilmu Bedah khususnya Onkologi dan Ilmu Histopatologi.

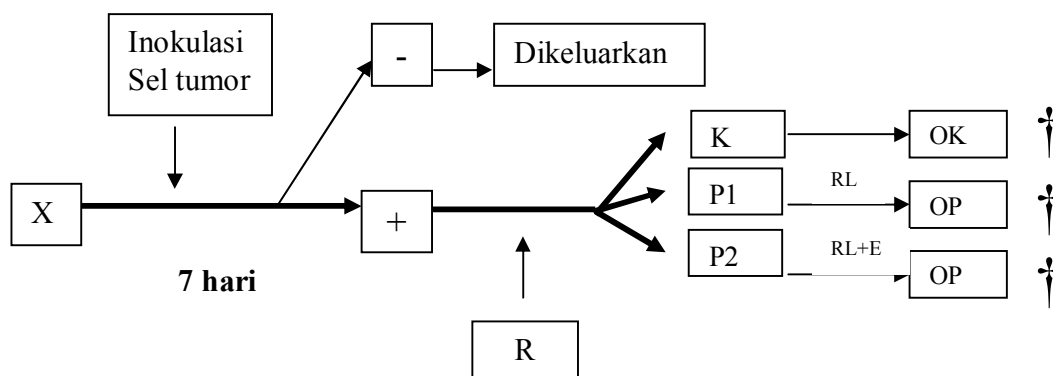
#### 4.2. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Gajahmada, Yogyakarta. Waktu penelitian adalah mulai bulan Maret 2008 sampai dengan bulan Juni 2008.

#### 4.3. Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *post test only control groups design*

Kelompok penelitian dibagi secara acak menjadi 3 kelompok yaitu kontrol, perlakuan 1 dan perlakuan 2 seperti yang tampak pada skema berikut:





Keterangan:

X = Aklimatisasi Tikus

R = Randomisasi

K = Kelompok kontrol

P = Kelompok perlakuan (P1, P2)

OK = Pengamatan pada kelompok kontrol

OP = Pengamatan pada kelompok perlakuan (OP1, OP2)

RL = Renjatan listrik

E = Echinace

† = Mencit dibunuh

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

Kriteria pemilihan sampel:

- a. Mencit betina
- b. Strain C3H
- c. Umur 6 bulan
- d. Berat badan  $\pm$  30 gram (setelah aklimatisasi)
- e. Sehat, tampak aktif
- f. Tidak ada abnormalitas anatomis yang tampak

#### **4.4. Besar sampel**

Besar sampel ditentukan berdasarkan kriteria WHO yaitu minimal adalah 5 mencit perkelompok<sup>65</sup>.

Bila diperhitungkan kemungkinan *drop out* akibat mencit mati selama pemeliharaan dan besarnya diperkirakan adalah 10% maka besar sampel untuk setiap kelompok adalah:

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

Besar sampel untuk setiap kelompok adalah 6 mencit. Total sampel untuk 3 kelompok adalah 18 mencit.<sup>67</sup>

#### 4.5. Metode alokasi kelompok

Metode alokasi kelompok dilakukan secara acak dengan metode acak sederhana berdasarkan tabel angka random

#### 4.6. Variabel penelitian

##### 4.6.1. Variabel bebas

- a. Pemberian stressor berupa *electric foot shock*
- b. Pemberian ekstrak Echinacea

##### 4.6.2. Variabel terikat

- a. Sebaran limfosit disekitar sel kanker payudara
- b. Jumlah sel mononuklear (Sel NK dan CTL) yang mensekresi perforin

##### 4.6.3. Definisi operasional

No.	Variabel	Skala
a.	<p><b>a.1. Stressor <i>Electric foot shock</i></b></p> <p>Mendapat stressor renjatan listrik (RL) dengan <i>electric foot shock</i> dengan besar arus 3 mA. Renjatan listrik diberikan selama 10 hari. Skema pemberian</p>	-

	<p>ditampilkan pada cara kerja</p> <p><b>a.2. Ekstrak Echinacea</b></p> <p>Ekstrak Echinacea purpurea diperoleh dari industri farmasi, dalam bentuk ekstrak (pelarut ethanol 60%) dari bunga, batang, daun dan akar. Dosis yang diberikan adalah 5,85 mg/hari peroral melalui sonde. Dosis tersebut diperoleh berdasarkan tabel konversi untuk dosis mencit. Pemberian diberikan pada pagi hari pada waktu yang sama sampai dengan penelitian selesai.</p>	
b.	<p><b>Sebukan sel limfosit disekitar sel kanker payudara</b></p> <p>Sebukan limfosit sekitar kelompok sel kanker payudara adalah sebaran limfosit sekitar kelompok sel kanker payudara (Dilihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 400X). Dihitung persentase jumlah limfosit tiap lapangan pandang besar.</p>	<b>Rasio</b>
c.	<p><b>Jumlah sel mononuklear (Sel NK dan CTL) yang memsekresi perforin disekitar sel kanker payudara</b></p> <p>Jumlah sel mononuklear yang mensekresi perforin disekitar sel kanker diperiksa dengan metode imunohistokimia. (Dilihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 400x). Dihitung jumlah sel mononuklear yang mensekresi perforin tiap 100 sel kanker.</p>	<b>Rasio</b>

## **4.7. Bahan dan cara kerja**

### **4.7.1. Bahan**

Mencit strain C3H diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Selama penelitian, setiap mencit ditempatkan pada kandang sesuai dengan kelompoknya. Satu kandang diisi 3 – 4 mencit. Pencahayaan, suhu serta kelembaban yang sama. Pakan yang diberikan pelet standar pakan mencit. Pakan dan minum diberikan secara *ad libitum*. Aklimatisasi untuk adaptasi sebelum perlakuan adalah selama 1 minggu. Kandang dibersihkan setiap hari dan frekuensi dan tingkat kebersihan adalah sama

Sel kanker payudara (adenokarsinoma mamma) diperoleh dari mencit donor. Mencit donor diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi (PA) Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Tumor yang mengandung sel kanker dari mencit donor akan ditranplantasikan ke mencit resipien. Sebagian jaringan tumor akan dikirim ke laboratorium PA FK UGM untuk konfirmasi jenis tumor.

Echinacea yang digunakan diperoleh dari industri farmasi berupa Echinacea purpurea (PT. S, Semarang) diperoleh dalam bentuk ekstrak (pelarut ethanol 60%) dari bunga, batang, daun dan akar.

Bahan dan alat untuk pemeriksaan laboratorik diuraikan pada sub bab masing-masing metode pemeriksaan

### **4.7.2. Cara kerja**

Mencit diaklimatisasi selama kurang lebih 1 minggu sebelum digunakan untuk penelitian. Mencit mendapat pakan standar dan minum ad libitum.

#### **4.7.2.1. Prosedur transplantasi jaringan tumor pada mencit**

##### **a. Alat :**

1. Cawan petri ukuran 6 Cm
2. Cawan petri ukuran 15 Cm
3. Cawan ukuran 10 Cm
4. Spuit 1cc
5. Jarum suntik trocar
6. Gunting lurus 10 Cm
7. Gunting bengkok 10 Cm
8. Pinset anatomi 10 Cm
9. Pinset biasa 12 Cm
10. Alas fiksasi

##### **b. Bahan :**

1. Alkohol 70 %
2. Larutan Garam fisiologik
3. Es batu
4. Mencit donor bertumor
5. Mencit resipien

##### **c. Prosedur :**

1. Mencit donor dimatikan dengan eter, kemudian diletakkan terlentang pada tatakan / alas fiksasi dan keempat kakinya difiksasi dengan jarum.
2. Kulit dibagian 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 atau kiri mencit dengan dosis 0,2 ml.
6. Sisa tumor yang padat dimasukkan ke dalam botol formalin untuk pemeriksaan histopatologis.
7. Masing-masing mencit diberi nomor pada telinga dan dimasukkan ke dalam kandang yang diberi label berisi informasi tentang jenis kelompok perlakuan dan tanggal transplantasi.

#### **4.7.2.2. Perlakuan untuk masing-masing kelompok penelitian**

- a. Kelompok pertama hanya mendapatkan makanan standar, setelah dilakukan inokulasi tumor dan timbul tumor pada aksila kanan atau kiri, pada hari ke 10 setelah randomisasi mencit dibunuh untuk diperiksa sebaran limfosit disekitar sel kanker dan jumlah sel mononuklear yang mensekresi perforin disekitar sel kanker.
- b. Kelompok kedua selain mendapatkan makanan standar juga mendapatkan stresor renjatan listrik menggunakan *electric foot shock*. Pada hari ke 10 setelah inokulasi dan timbul tumor pada aksila kanan atau kiri, mencit dibunuh untuk diperiksa sebaran sel limfosit disekitar sel kanker payudara dan jumlah sel mononuklear yang mensekresi perforin disekitar sel kanker.
- c. Kelompok ketiga selain mendapatkan stressor renjatan listrik menggunakan *electric foot shock* juga mendapatkan ekstrak *Echinacea purpurea*. Pada hari ke 10 setelah inokulasi dan timbul tumor pada aksila kanan atau kiri mencit dibunuh untuk diperiksa sebaran sel limfosit disekitar sel kanker payudara dan jumlah sel mononuklear yang mensekresi perforin disekitar sel kanker

#### **4.7.2.3. Stressor renjatan listrik**

Stressor renjatan listrik (RL) dengan *electric foot shock* dengan besar arus 3 mA pada tegangan 220 Volt. Renjatan listrik diberikan selama 10 hari dengan skema pemberian sebagai berikut:

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

Lama 1 kali renjatan = 1 kejutan diberikan dengan interval 4 menit. Hari ke-1 diberikan 4 renjatan sebanyak 2 sesi, hari ke-2 diberikan 8 renjatan sebanyak 2 sesi. Pemberian renjatan pada hari ke-2 sebanyak 8 renjatan, oleh karena peningkatan 2 renjatan yaitu 6 renjatan sebanyak 2 sesi dianggap tidak adekuat. Pemberian renjatan hari berikutnya sesuai tabel diatas.

Pemilihan stressor berupa renjatan listrik pada alas kaki dengan *electric foot shock* oleh karena intensitas renjatan dapat terukur secara tepat, penjalaran arus listrik dari kaki ke seluruh tubuh termasuk ke otak berjalan secara cepat dan segera terjadi pemulihan tanpa ada efek samping setelah renjatan. Pemberian stressor RL selama 10 hari adalah berdasarkan penelitian terdahulu dimana kadar kortisol plasma akan mulai meningkat pada hari ke-4 pemberian renjatan dan

mencapai puncak pada pemberian ke-7 renjatan dan akan menurun pada hari ke-14 renjatan. Berdasarkan hal tersebut diharapkan pada hari ke-11 yaitu pasca pemberian renjatan selama 10 hari sudah terjadi peningkatan respon imun.<sup>66</sup>

#### **4.7.2.4. Prosedur pengecatan perforin**

##### **a. Bahan :**

1. Polinized slide
2. Xylol
3. Alkohol absolut
4. Tris Hcl ( pH 7,6 )
5. Periodic acid 0,5 %
6. 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam metanol
7. Blok 1 % BSA – PBS
8. Biotinylated Rabbit anti Mouse
9. AB Complex
10. DAB
11. Perforin mouse Ab
12. Hematoksilin
13. Entelan

##### **b. Prosedur :**

1. Fiksasi dengan Polinized slide 3 menit
2. Deparafinisasi dengan xylol
3. Rehidrasi dengan Alkohol absolut , kemudian dengan air murni

4. Cuci dengan 50mM Tris – HCl (pH 7,6) selama 5 menit
5. Periodic acid 0,5 % selama 10 menit
6. 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam metanol selama 20 menit
7. cuci dengan 50nM Tris-HCl (pH 7,6) selama 5 menit
8. Blok dengan 1% BSA-PBS selama 30 menit
9. Perforin Mo Ab selama 1 jam
10. Cuci dengan 50 mM Tris-HCl selama 5 menit, 2X
11. Biotinylated Rabbit anti mouse 1 jam
12. Cuci dengan 50 mM Tris-HCl selama 5 menit, 2X
13. AB Complex selama 30 menit
14. Cuci dengan 50 mM Tris-HCl selama 5 menit, 2X
15. DAB dalam Tris –HCl kurang dari 10 menit
16. Counterstain Hematoksilin
17. Dehidrasi
18. Clearing
19. Mountaing dengan Entelan

#### **4.7.2.5. Prosedur pemeriksaan sebukan sel limfosit secara histopatologis**

##### **a. Bahan :**

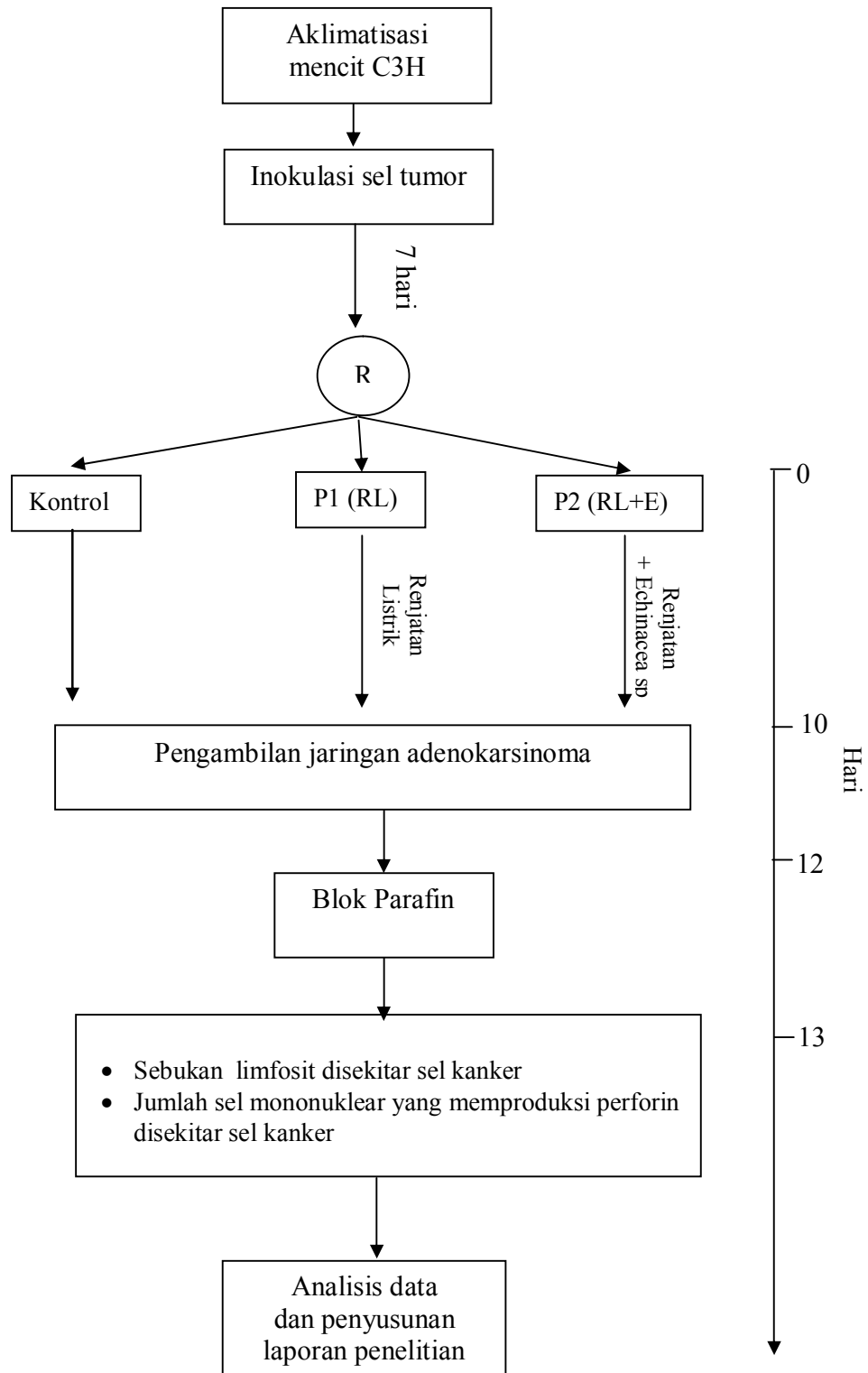
1. Formaldehid 10%
2. Ethanol 70%
3. Ethanol 80%
4. Ethanol 90%

5. Larutan Xylol
6. Paraffin wax
7. Mikrotom
8. Albumin

**b. Cara Kerja**

1. Jaringan tumor yang telah dipindahkan dari mencit difiksasi dengan formaldehid 10% selama 24 jam pada suhu kamar.
2. Selanjutnya jaringan dimasukkan ke dalam ethanol 70% selama 1,5 jam pada suhu kamar.
3. Jaringan dimasukkan ke dalam ethanol 80% selama 1,5 jam pada suhu kamar
4. Jaringan dimasukkan ke dalam ethanol 90% selama 1,5 jam pada suhu kamar
5. Setelah proses dehidrasi, jaringan tumor dipindahkan ke dalam larutan xylol sehingga bersih
6. Jaringan ditempatkan pada paraffin wax
7. Jaringan dipotong dengan mikrotom
8. Slide dimounting dengan albumin
9. Dilakukan pengecatan dengan hamatoxilin eosin
10. Dilakukan pembacaan dengan mikroskop dengan pembesaran 400x

#### 4.8. Alur penelitian



#### **4.9. Analisis data**

Setelah data terkumpul akan dilakukan *data cleaning*, coding, tabulasi dan dimasukkan kedalam komputer. Analisis data meliputi analisis deskriptif dan uji hipotesis. Pada analisis deskriptif yaitu sebaran limfosit disekitar sel kanker dan sekresi perforin dipaparkan dalam bentuk rerata. Uji hipotesis dilakukan dengan Uji ANOVA yang dilanjutkan dengan Uji Pos Hoc Bonferroni. Sebelum uji ANOVA dilakukan, diperiksa asumsi untuk Uji ANOVA yaitu normalitas distribusi dan homogenitas varians dari data. Batas derajat kemaknaan adalah apabila  $P \leq 0,05$  dengan 95% interval kepercayaan. Analisa data dilakukan dengan program komputer SPSS 15.0 for Windows (SPSS Inc, USA).

#### **4.10. Etika penelitian**

Pada penelitian ini sudah dimintakan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran UNDIP. Seluruh hewan coba akan dirawat sesuai standar pemeliharaan binatang.

## BAB 5

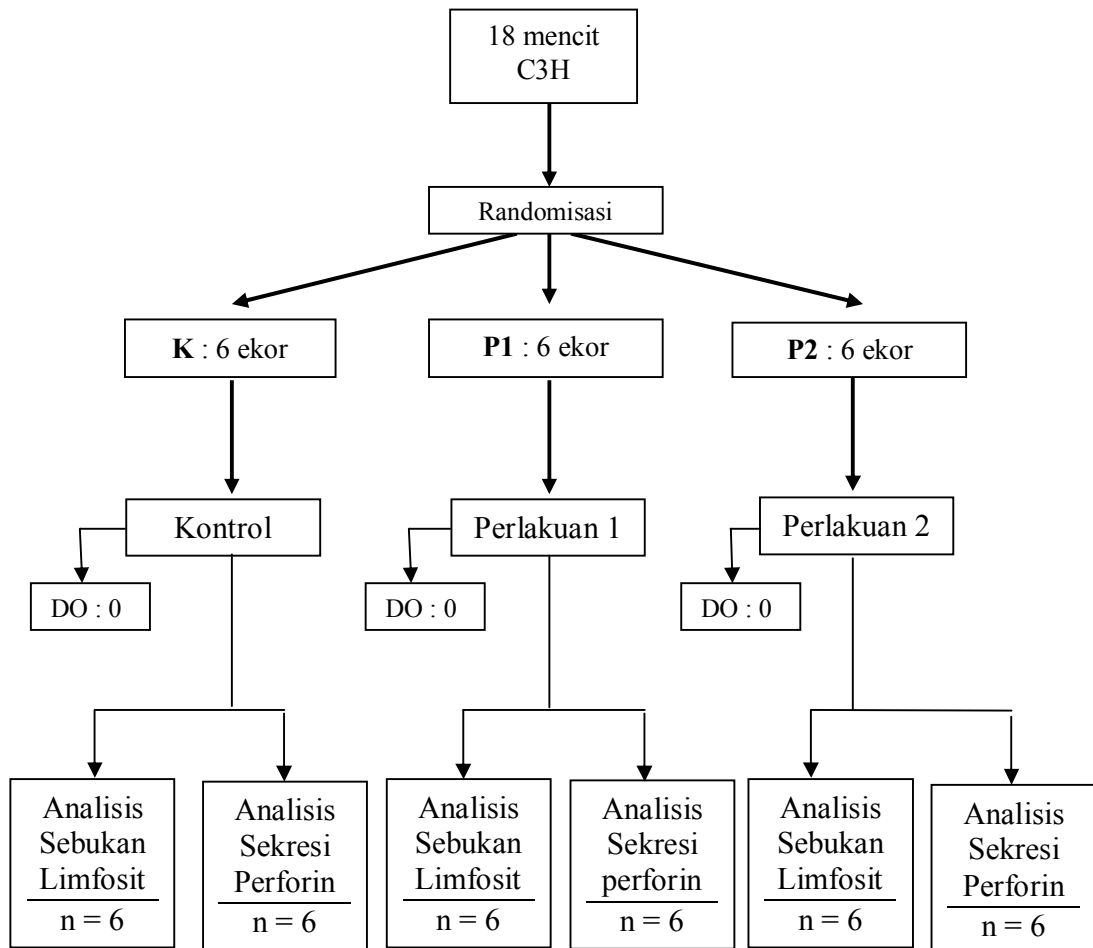
### HASIL

#### 5.1. Sebaran sel limfosit dan sekresi perforin

Sebaran limfosit di sekitar sel kanker payudara adalah sebaran limfosit sekitar kelompok sel kanker payudara. Sebaran limfosit tersebut diukur dengan melihat sel limfosit dibawah mikroskop dengan pembesaran 400X.

Sedangkan jumlah sel mononuklear yaitu sel NK dan CTL yang mensekresi perforin disekitar sel kanker diperiksa dengan metode imunohistokimia. Dihitung jumlah semua sel mononuklear yang berwarna coklat (dengan pewarnaan *antibody monoclonal anti-perforin*) dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Pengukuran tersebut dilakukan oleh 2 orang yaitu peneliti dan seorang ahli Patologi Anatomi.

Penelitian ini dilakukan pada 18 sampel dimana dikelompokkan menjadi tiga kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol, kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2. Kelompok kontrol pada mencit C3H hanya diberikan pakan standar, kelompok perlakuan 1 mencit C3H diberikan stresor berupa renjatan listrik dan kelompok perlakuan 2 selain stresor renjatan listrik juga diberikan Echinacea. Tidak didapatkan *drop out* pada seluruh kelompok dari penelitian ini.



**Gambar 15.** Diagram skematik hasil penelitian

## 5.2 Hasil pengukuran sebulan sel limfosit dan sekresi perforin

Dari hasil pengukuran sebulan sel limfosit dan perforin di sekitar sel kanker mencit C3H dengan kanker payudara pada tiap kelompok percobaan dapat dilihat pada tabel 3

**Tabel 3.** Nilai rata-rata hasil perhitungan sebulan sel limfosit dan perforin pada tiap kelompok percobaan

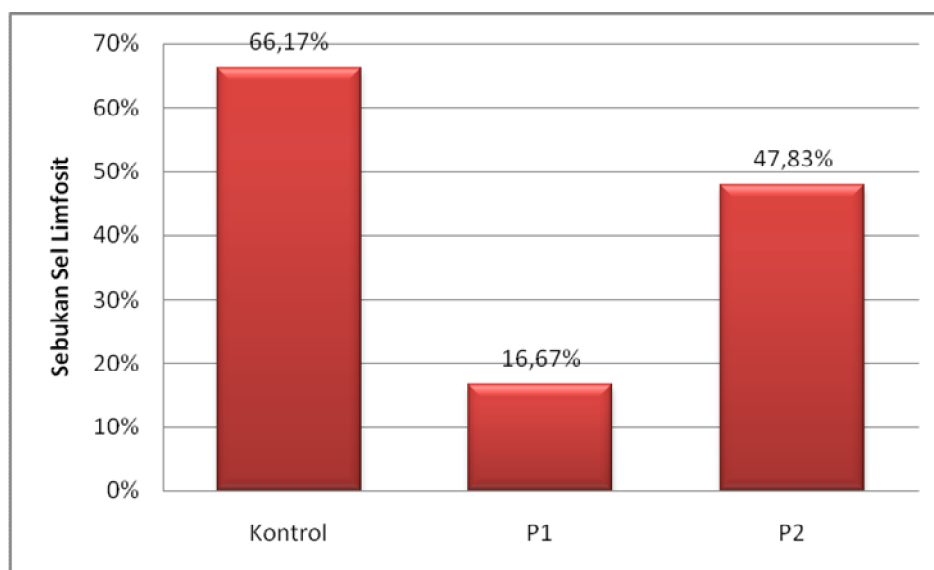
	Kontrol	Perlakuan 1	Perlakuan 2
Rerata % (SB) sebulan sel limfosit	66,2 ± 2,7	16,7 ± 4,7	47,8 ± 1,7
Rerata (SB) perforin	9,1 ± 0,28	7,8 ± 0,25	8,7 ± 0,39

Kemudian dilakukan uji normalitas data sebulan sel limfosit dan perforin dengan Shapiro-Wilk menunjukkan bahwa ke dua data tersebut berdistribusi normal ( $p > 0,05$ ). Hasil selengkapnya dapat dilihat pada lampiran.

Data yang berdistribusi normal tersebut dapat dilakukan uji beda dengan *one way ANOVA*. Hasil uji homogenitas varian dilihat dari *output Levene's test*. Nilai  $p$  pada *Levene's test* menunjukkan lebih besar dari 0,05. Hal ini berarti varian data sebulan sel limfosit dan perforin pada ketiga kelompok tersebut adalah homogen.

Hasil *one way ANOVA* data sebulan sel limfosit menunjukkan ada perbedaan bermakna sebulan sel limfosit minimal satu pasang kelompok di antara ke tiga kelompok tersebut. Untuk mengetahui kelompok mana saja, maka dilakukan *post hoc* dengan *Bonferoni test*. Hasilnya adalah terdapat perbedaan

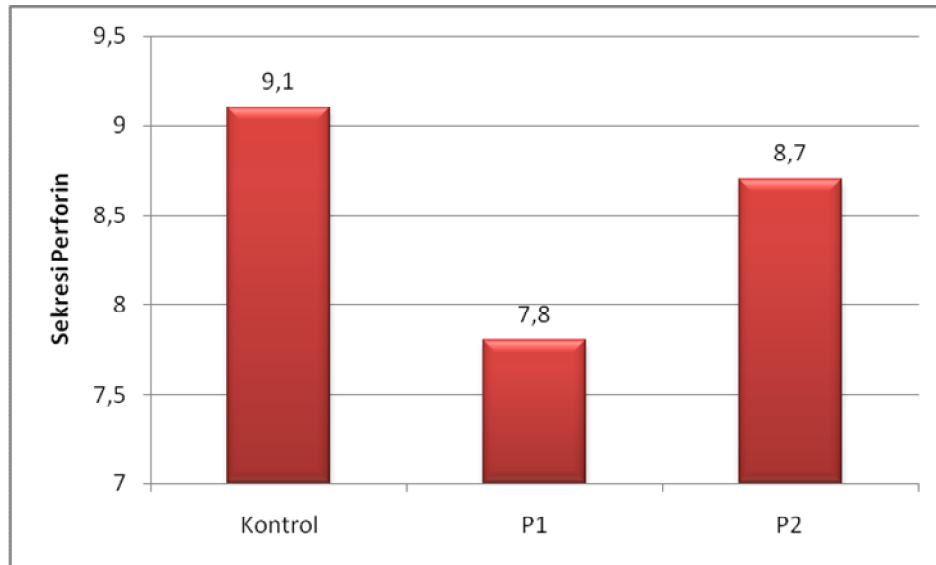
bermakna ( $p = 0,001$ ) persentase sebulan sel limfosit antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 1 maupun kelompok perlakuan 2 (Gambar 13). Demikian juga terdapat perbedaan bermakna ( $p = 0,001$ ) persentase sebulan sel limfosit antara kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2.



**Gambar 13.** Persentase sebulan limfosit pada kelompok penelitian

Hasil *one way ANOVA* data perforin menunjukkan ada perbedaan bermakna perforin minimal satu pasang kelompok di antara ke tiga kelompok tersebut. Untuk mengetahui kelompok mana saja, maka dilakukan *post hoc* dengan *Bonferoni test*. Hasilnya adalah terdapat perbedaan bermakna ( $p = 0,001$ ) perforin antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 1 ( $p = 0,001$ ). Namun tidak terdapat perbedaan bermakna ( $p = 0,2$ ) antara kelompok

kontrol dan kelompok perlakuan 2 (Gambar 14). Terdapat perbedaan bermakna ( $p = 0,001$ ) perforin antara kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2.



**Gambar 14.** Sekresi perforin pada kelompok penelitian

## **BAB 6**

### **PEMBAHASAN**

Diantara 18 ekor mencit C3H dalam penelitian, ternyata tidak ada satu pun dari ketiga kelompok perlakuan yang mengalami *drop out*. Pada kelompok kontrol, yaitu mencit C3H dengan adenokarsinoma payudara yang hanya mendapat pakan standart terlihat bahwa rerata jumlah sebukan limfosit di sekitar sel kanker adalah 66,2 ( $\pm 2,7$ ). Sedangkan jumlah sel mononuklear (Sel NK dan CTL) yang mensekresi perforin didapat rerata 9,1 ( $\pm 0,28$ ). Jumlah ini menggambarkan sebukan sel limfosit di sekitar sel kanker dan sekresi perforin pada mencit yang menderita adenokarsinoma payudara.

Pada kelompok perlakuan 1 (P1), dimana mencit C3H dengan adenokarsinoma payudara yang diberi renjatan listrik, terlihat bahwa terjadi penurunan jumlah sebukan sel limfosit di sekitar sel tumor secara signifikan ( $p=0,001$ ) dibandingkan dengan kelompok kontrol, yaitu dari 66,2 pada kelompok kontrol menjadi 16,7 pada kelompok P1.

Adanya penurunan jumlah sebukan sel limfosit pada kelompok P1 ini disebabkan oleh karena stres (renjatan listrik) yang diberikan pada kelompok ini. Stres disini akan mempengaruhi imunitas tubuh dengan cara menstimulasi sekresi kortisol dan adrenalin dari korteks dan medula adrenal. Juga berpengaruh terhadap pelepasan noradrenalin dari postganglion simpatik terminal saraf di pembuluh darah dan organ lymfoid. Efek sistemik dari glukokortikoid dan katekolamin ini

mempengaruhi pengaturan sitokin tipe 1 dan tipe 2. Stres akan menurunkan produksi sitokin tipe 1 yang dibutuhkan dalam menanggapi infeksi bakterial melalui respon imunitas seluler, sehingga akan terjadi hambatan ekspresi IL-2, INF- $\gamma$  dan IL-12 yang sangat penting untuk stimulasi sel-sel dalam sistem imun seluler seperti limfosit, Sel NK, Cytotoxic T-cell Lymphocyte (CTL), dan makrofag.

Pada kelompok perlakuan 2 (P2) di mana pada kelompok ini selain diberi stres juga diberikan imunostimulator (*Echinacea* sp), didapat bahwa sebaran sel limfosit di sekitar sel kanker juga menurun ( $p=0,001$ ) dibandingkan kelompok kontrol, yaitu dari 66,2 pada kelompok kontrol menjadi 47,8 pada kelompok P2. Namun bila dibandingkan dengan kelompok P1, maka pada kelompok P2 terlihat bahwa sebaran sel limfosit disekitar sel kanker terjadi peningkatan dan berbeda bermakna ( $p=0,001$ ). Jadi hal ini membuktikan bahwa pemberian imunostimulator (*Echinacea* sp) pada mencit C3H adenokarsinoma payudara dengan stress akan meningkatkan jumlah sebaran sel limfosit di sekitar sel kanker. Hal ini terjadi karena Imunostimulator *Echinacea* yang diberikan akan mengaktifasi makrofag sehingga makrofag menjadi aktif dan menghasilkan sitokin-sitokin yang penting untuk aktifitas imunitas seluler. Sitokin yang diproduksi dalam imunitas seluler akan menyebabkan efek kemotaksis sehingga akan menyebabkan peningkatan jumlah sebaran sel limfosit maupun sel mononuklear di sekitar sel tumor. Adanya peningkatan sebaran sel limfosit ini mempunyai nilai prognostik yang lebih baik, karena kecepatan pertumbuhan sel kanker akan menurun.

Sekresi perforin oleh sel mononuklear (Sel NK dan CTL) pada kelompok kontrol, yaitu pada mencit C3H dengan adenokarsinoma payudara didapat 9,1. Pada kelompok perlakuan 1 (P1), dimana diberikan stres (renjatan listrik) pada mencit C3H adenokarsinoma payudara, didapat bahwa sekresi perforin menurun secara bermakna ( $p=0,001$ ) bila dibandingkan dengan kontrol, yaitu dari 9,1 menjadi 7,8.

Penurunan sekresi perforin pada kelompok P1 disebabkan karena stres yang diberikan pada kelompok ini. Adanya stres ini akan berpengaruh terhadap imunitas tubuh melalui stimulasi sekresi kortisol dan adrenalin dari korteks dan medula adrenal. Juga berpengaruh terhadap pelepasan noradrenalin dari postganglion simpatik terminal saraf di pembuluh darah dan organ limfoid yang akan menyebabkan hambatan ekspresi IL-2, INF- $\gamma$  dan IL-12 yang berperan dalam imunitas seluler. Dengan adanya hambatan tersebut, akan menghambat juga sel NK dan CTL dalam mensekresi perforin.

Pada kelompok perlakuan 2 (P2) di mana pada kelompok ini selain diberi stres juga mendapatkan imunostimulator (*Echinacea* sp), terlihat juga penurunan sekresi perforin namun tidak bermakna ( $p=0,183$ ) bila dibandingkan kelompok kontrol, yaitu dari 9,1 pada kelompok kontrol menjadi 8,7 pada kelompok P2. Dibandingkan dengan kelompok P1 yang mendapatkan stress tetapi tidak mendapat imunostimulator, maka pada kelompok P2 yang mendapat imunostimulator, penurunan sekresi perforin tersebut berbeda bermakna ( $p=0,001$ ). Penurunan sekresi perforin pada kelompok P2 dibandingkan dengan kelompok kontrol adalah tidak bermakna ( $p=0,183$ ), hal ini membuktikan bahwa pemberian imunostimulator berupa

Echinacea pada mencit adenokarsinoma payudara dengan stress akan memperbaiki sekresi perforin oleh sel NK dan CTL. Efek imunostimulator Echinacea yang diberikan akan mengaktifasi makrofag dan meningkatkan TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , dan IL-12 yang penting untuk aktifitas imunitas seluler. Selain itu Echinacea akan menurunkan PGE<sub>2</sub> dengan akibat akan menyebabkan peningkatan secara langsung terhadap sel NK dalam memproduksi perforin.

Pada salah satu penelitian pada tikus, pemberian ekstrak Echinacea akan dapat meningkatkan fagositosis makrofag dan netrofil serta kemotaksis dari limfosit. Hal ini sesuai dengan penelitian ini, bahwa terjadi peningkatan sekuman limfosit di sekitar sel kanker. Sedangkan efek pada sel kanker sendiri, pada penelitian yang sama didapat juga peningkatan dari kemampuan CTL, dimana didapat peningkatan sampai 4 kali lipat<sup>47</sup>.

Penelitian lain secara laboratoris atau *in vitro*, Echinacea akan mengaktifasi dan meningkatkan jumlah sel NK melalui peningkatan produksi TNF- $\alpha$ , Interleukin-1, Interleukin-6. Aktivitas fagositosis, proliferasi seluler dan kapasitas dari killing sel tumor juga terjadi peningkatan.<sup>54,56</sup>

Pada penelitian untuk mengetahui jumlah produksi sel NK di lien dan sumsum tulang pada mencit tua normal yang mendapatkan diet *Echinacea purpurea* dibandingkan dengan yang mendapat suntikan tiroksin sebagai stimulator sel NK. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pembentukan sel-sel NK meningkat pada kelompok Echinacea dibanding yang mendapat suntikan tiroksin.<sup>61</sup>

Dari berbagai penelitian diatas, didapat hasil yang serupa yaitu berupa peningkatan sistem imun seluler, baik makrofag, limfosit, sel NK dan CTL pada pemberian Echinacea. Adanya peningkatan kemampuan sistem imun seluler tersebut akan dapat memberikan efek yang menguntungkan antara lain kemungkinan reduksi dari massa tumor. Sebaran limfosit di sekitar sel kanker akan dapat menurunkan kecepatan pertumbuhan sel kanker. Adanya sel mononuklear yang memproduksi perforin serta fagositosis oleh makrofag juga menyebabkan kematian dari sel-sel kanker. Namun demikian hal ini masih perlu dibuktikan lebih lanjut dalam penelitian selanjutnya.

## **BAB 7**

### **SIMPULAN DAN SARAN**

#### **7.1. Simpulan**

1. Terdapat peningkatan yang bermakna dari sebulan limfosit di sekitar sel tumor pada mencit C3H yang menderita adenokarsinoma payudara dan stres dengan pemberian imunostimulator Echinacea.
2. Terdapat peningkatan yang bermakna dari sekresi perforin oleh sel mononuklear (CTL dan Sel NK) pada mencit C3H yang menderita adenokarsinoma payudara dan stres dengan pemberian imunostimulator Echinacea.

#### **7.2. Saran**

1. Untuk menyempurnakan konsep pemikiran pada penelitian masih diperlukan penelitian lanjutan lagi, misalnya perkembangan massa tumor, sehingga bisa diaplikasikan secara klinis.
2. Adanya efek Echinacea yang dapat menyebabkan peningkatan jumlah sebulan limfosit di sekitar sel kanker dan sekresi perforin pada mencit C3H dengan adenokarsinoma dan stres, maka perlu dipikirkan pengembangan untuk kelanjutan uji klinik terhadap manusia.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Pane M. Aspek klinis dan epidemiologis penyakit kanker payudara. Available from: <http://www.tempo.co.id/medika/arsip/082002/pus-3.htm> Diakses tanggal 24 Maret 2007.
2. Tjindarbumi D, Mangunkusumo R. Cancer in Indonesia, present and future. *Jpn J Clin Oncol* 2002;32(Supplement 1):S17-S21.
3. Russo J, HU Y, Yang X, Russo IH. Developmental, Cellular, and molecular basis of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2000;27:17-37.
4. Moningkey SI. Epidemiologi kanker payudara. *Medika* 2000;5:326-9.
5. Sugito H. Kanker di Indonesia tahun 1994. Data histopatologik Badan registrasi Kanker Ikatan Ahli Patologi Indonesia. Dirjen YanMed Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 1994.
6. Sarjadi, Trihartini. Cancer registration in Indonesia. *Asian Pacific J Cancer* 2001; 2(Supplement):21-24.
7. Anonim. Dinas Profil kesehatan propinsi Jawa Tengah tahun 2004. Kesehatan Propinsi Jawa Tengah, 2005.
8. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 3<sup>rd</sup> Ed. WB. Saunders Company: Philadelphia, 1997.
9. Constatinides P. General pathobiology. Connecticut: Appleton & Lange, 1994
10. Contran RS, Kumar V, Robbins SL. Robin Pathologic basis of disease. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia : WB Saunders, 1994.

11. Lehmann C, Zeis M, Schmitz N, Uharek L. Impaired binding of perforin on the surface of tumor cells is a cause of target cell resistance against cytotoxic effector cells. *Blood*. 2000;96:594-600.
12. Smyth MJ, Thia KYT, Cretney E, Kelly JM, Snook MB, Forbes CA, Scalzo AA. Perforin Is a Major Contributor to NK Cell Control of Tumor Metastasis. *J Immunol* 1999;162: 6658–62.
13. Elemkov IJ and Chrousos GP. Stress hormones, Th1/th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and susceptibility to disease. *TEM*. 1999;10(9):359-68.
14. Kligler B. Echinacea. *Am Fam Physician* 2003;67:77-80.
15. Block KI, Mead MN. Immune system effects of echinacea, ginseng, and astragalus: A review. *Integr cancer Ther* 2003;2:247-67.
16. See D, Broumand N, Sahl L, Tilles J. In vitro effects of echinacea and ginseng on natural killer and anti-body-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients. *Immunopharmacology*. Jan 1997; 35(3): 229-35.
17. Bratman S, Kroll D. *Natural Health Bible*. Prima Publishing. 1999; 179-81
18. Currier NL, Miller SC. Natural Killer cells from aging mice treated with extracts from echinacea purpurea are quantitatively and functionally rejuvenated. *Exp Gerontol*. 2000 Aug;35(5): 627-39

19. Goel V, Chang C, Slama J, Barton R, Bauer R, Gahler R, Basu T. Echinacea stimulates macrophage function in lung and spleen of normal rats. *J Nutr Biochem.* 2002;13(8):487
20. Martini F. *Fundamental of anatomy and physiology.* New Jersey: Prentice Hall, 1989.
21. Virginia KL, Colin AP, Raman Q, Edwin DS. Breast cancer. In: *Clinical oncology* 7<sup>th</sup> ed, Philadelphia, WB Saubders Company, 1993:187-94
22. Nambiar. Breast cancer in Singapore. The 10<sup>th</sup> Asia Pasific cancer conference. 1<sup>st</sup> ed. IAP. Beijing.1991.
23. Chandrasekhar A. Ten Years review of mammary cancer. The 10th APCC. 1st ed. IAP. Beijing.1991.
24. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Registrasi kanker di 15 Pusat Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran di Indonesia. 1983;15:16-30.
25. Anonim, Breast cancer : Prevention health professional version. Available from : <http://www.cancer.gov>. Diakses tanggal 21 Mei 2007
26. Stites DP, Terr AI, Parslow TG. *Medical Immunology* 9th. International Edition London : Appleton & Lange A Simon & Schuster Co ; 1997 : 65-9, 147, 631-7.
27. Robbin SL, Cotran RS, Kumar V. *Dasar Patologik Penyakit.* Jilid 1. Alih Bahasa Yunti MR. Jakarta: Bina Rupa Aksara. 1994 ; 135-66.

28. Wunderlich JR, Restifo NP. Essentials of Immunology Cancer : Principles and Practice of Oncology, 5<sup>th</sup> ed, Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia 1997; 3:47-75
29. Dickson RB, Lippman ME. Cancer of the Breast : Principles and Practice of Oncology, 5<sup>th</sup> ed, Lippincot-Raven Publishers , Philadelphia 1997; 36:1541-1616
30. Robinson EK., Hunt KK., Noninvasive Breast Cancer, The M.D. Anderson Surgical Oncology Handbook 2<sup>nd</sup> Ed. Houston, Texas : Lippincott Williams & Wilkins, 1999; 1:1-12
31. Ahearne PM., Leach SD., Feig BW.. Invasive Breast Cancer. The M.D. Anderson Surgical Oncology Handbook 2<sup>nd</sup> Ed. Houston, Texas : Lippincott Williams & Wilkins, 1999; 2:13-37
32. Anonim. Kumpulan Naskah Ilmiah Perhimpunan Ahli Bedah Onkologi Indonesia (PERABOI) Mukhtamar Nasional VI, Semarang : 2003
33. AJCC Cancer Staging Handbook 6<sup>th</sup> Ed. Chicago : Springer, 2002
34. Anonim. Comprehensive practical approaches management of breast cancer, Surabaya, 2004; 28-29.
35. Elenkov I, Calcagni E. Stress system activity, Innate and T helper cytokines, and susceptibility to immune related disease, Rome Italy [www.depts.ttu.edu/porkindustryinstitute](http://www.depts.ttu.edu/porkindustryinstitute). Diakses 28 Mei 2007
36. Roitt IM, Essential Immunology 6<sup>th</sup> ed, Blackwell Sci, London 1988

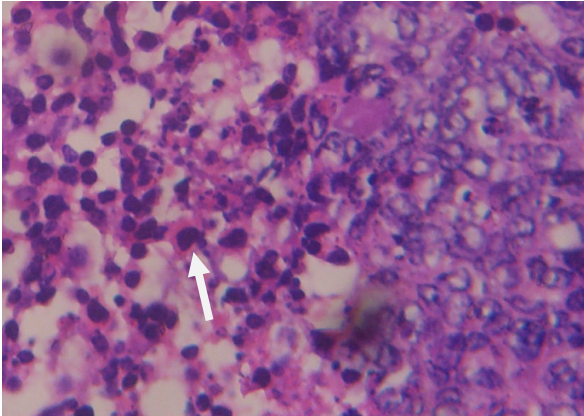
37. Goodman JW, The Immune Response, in Basic and clinical Immunology 8<sup>th</sup> ed, Prentice-Hall Int.Inc, USA
38. Rosenthal AS, Shevach EM. Function of Macrophages in Antigene Recognition by Guinea Pig T-Lymphocytes. I.Requirement for Histocompatibility Macrophages and Lymphocytes. J. Exp. 1973; 138:1194-1211.
39. Lipsky PE, Rosenthal AS. Macrophage-Lymphocyte interaction –Antigene Mediated Physical Interaction Between Immune Guinea Pig Lymph Node Lymphocyte test and Syngenic Macrophages. J. Exp.Med, 1975; 141:138-154.
40. Mc.Connel, Munro A, Waldman H. The Immune System, A Course on The Molecular and Cellular Basis of Immunity. 2<sup>nd</sup> ed. ,Blackwell Scientific Pub.,London. 1981.
41. Subowo, 1993. Imunobiologi. Cetakan ke-1, Penerbit Angkasa, Bandung
42. Goodman JW, 1994. The Immune Response, in Basic and Clinical Immunologi. 8<sup>th</sup> ed. Stites DP, Terr A I eds.,Prentice-Hall Int.Inc.,USA
43. Constatinides P. General Pathobiologi. Connecticut: Appleton & Lange, 1994
44. Sarjadi. Karsinoma epidermoid serviks uteri (Beberapa aspek epidemiologi serta peran histopatologi dan petanda tumor dalam penentuan prognosis). Disertasi doktor Universitas Diponegoro. Semarang, 1985.
45. Contran RS, Kumar V, Robbins SL. Robin Pathologic basis of Disease. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia : WB Saunders, 1994.

46. Kawasaki, et al. Perforin, a pore-forming protein detectable by monoclonal antibodies, is a functional marker for killer cells. *International Immunology*. 1990;2: 677-684.
47. Abba T.I, Parslow TP, Stites DP, .*Medical Immunology*, 9<sup>th</sup> ed, Stamford Connecticut, USA: Appleton & Lange, 1997.
48. Whiteside TL, Haberman RB. Characteristics of natural killer cell and lymphokine-activated killer cells. In: Oettgen H.F ed. *Human cancer immunology*. WB saunders company philadelphia 1990
49. Trapani JA,. Smyth MJ, Fuctional Significance of The Perforin/Granzyme Cell Death Pathway, <http://nature.com/reviewa/immunol/>. Diakses tanggal 28 Mei 2007
50. Anonim. Cancer and the immune system : The vital connection. <http://www.cancerresearch.org/immunology/oncogen>. Diakses tanggal 14 Mei 2007
51. Fiebert SG, Kamper KJ. Echinacea (E. angustifolia, E. pallida, and E. purpurea), <http://www.mcp.edu/herbal/default.htm>. Diakses tanggal 28 Mei 2007
52. Anonim. Evidence-based complementary and alternative medicine, <http://ecam.oxfordjournal.org/cgi/content/full>. Diakses tanggal 24 Mei 2007
53. Giles JT, Palat CT, Susan CH, Chang ZG, Kennedy DT. Evaluation of Echinacea for Treatment of the Common Cold. *Pharmacotherapy*, 2000; 20(6):690-7

54. Blumenthal M, Riggins C. Popular herbs in the U.S. market: therapeutic monographs. Austin, TX: American Botanical Council 1997;1-68.
55. Bartram T. Encyclopedia of Herbal Medicine. Grace Publishers, Dorset, England. 1995; 161-2.
56. Bauer R. Echinacea species as potential immunostimulatory drugs. Econ Med Plant Res. 1991; 5: 253-321.
57. Wagner V. Immunostimulating polysaccharides (heteroglycans) of higher plants. Arzneimittelforschung. 1985; 35: 1069-75
58. Stimpel M. Macrophage activation and induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fractions from the plant Echinacea purpurea. Infect Immun. 1984; 46: 845-49
59. Luettig B. Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of Echinacea purpurea. J Natl Cancer Inst. 1989; 81: 669-75
60. Mose J. Effect of echinacea on phagocytosis and natural killer cells. Med Welt. 1983; 34: 1463-7
61. Vomel V. Influence of a non-specific immune stimulant on phagocytosis of erythrocytes and ink by the reticuloendothelial system of isolated perfused rat livers of different ages. Arzneimittelforschung. 1984; 34: 691-95
62. Brighthope I, Fitzgerald P. The AIDS Fighters. Keats Publishing, New Canaan, Conn. 1987; 10: 134

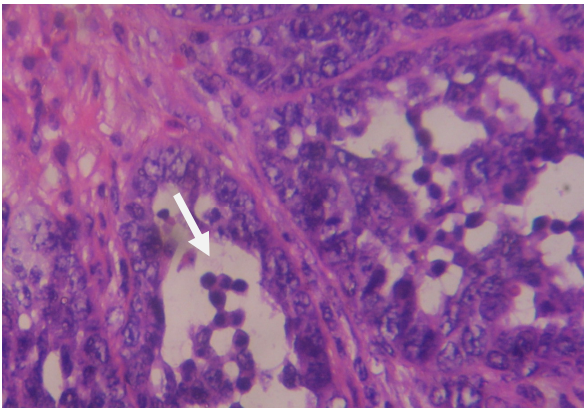
63. Gallo M, Sarkar M, Au W, Pietrzak K, Comas B, Smith M, Jaeger TV, Einarson A, Koren G. Pregnancy outcome following gestational exposure to echinacea: a prospective controlled study. *Arch Intern Med.* 2000 13;160(20):3141-3.
64. Collins E, Berkoff N. *Everything You Need to Know About Echinacea and Immunity.* Roseville, CA:Prima Publishing;1999;85-6
65. World Health Organization. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. 1993;44.
66. Asnar E. Peran perubahan limfosit penghasil sitokin dan peptida motilitas usus terhadap modulasi respon imun mukosal tikus yang stress akibat stressor renjatan listrik. Suatu pendekatan psikoneuroimunologi. (Disertasi).Program Pasca Sarjana Unair.2001
67. Lameshow S, Iwanga SK, Klar J, Hosmer DW. *Besar sample dalam penelitian kesehatan,* Gadjah Mada University Press; 1997

**LAMPIRAN 1. HASIL PEMERIKSAAN SEBUKAN LIMFOSIT**



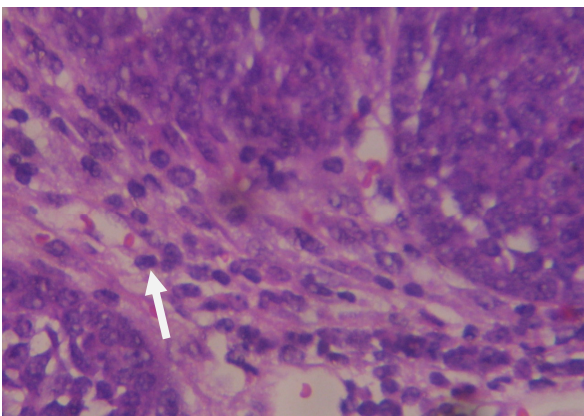
KONTROL

Sebukam limfosit  
disekitar sel  
kanker



PERLAKUAN 1

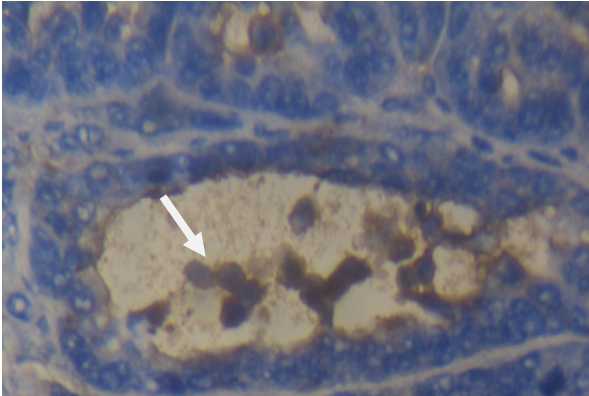
Sebukam limfosit  
disekitar sel  
kanker



PERLAKUAN 2

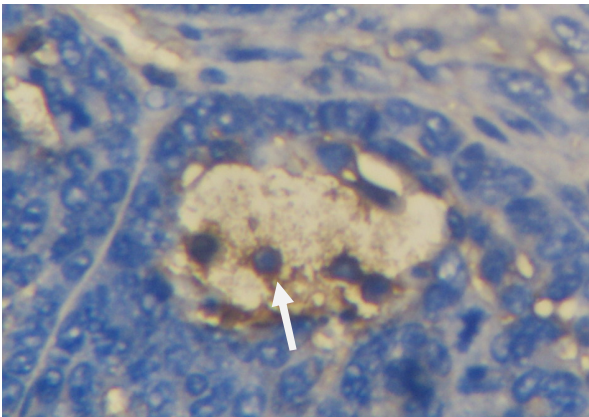
Sebukam limfosit  
disekitar sel  
kanker

**LAMPIRAN 2. HASIL PEMERIKSAAN SEKRESI PERFORIN**



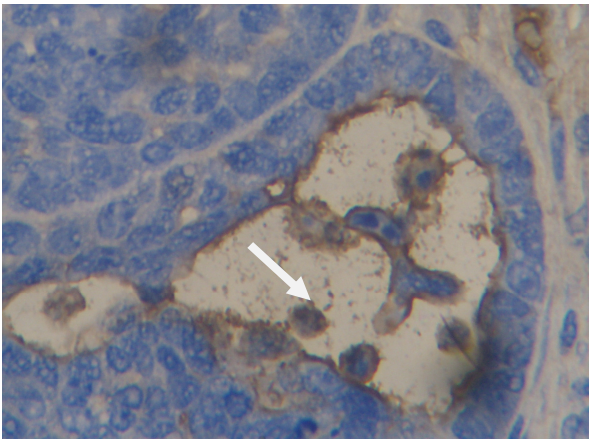
KONTROL

Sekresi sel perforin oleh sel mononuklear



PERLAKUAN 1

Sekresi sel perforin oleh sel mononuklear



PERLAKUAN 2

Sekresi sel perforin oleh sel mononuklear

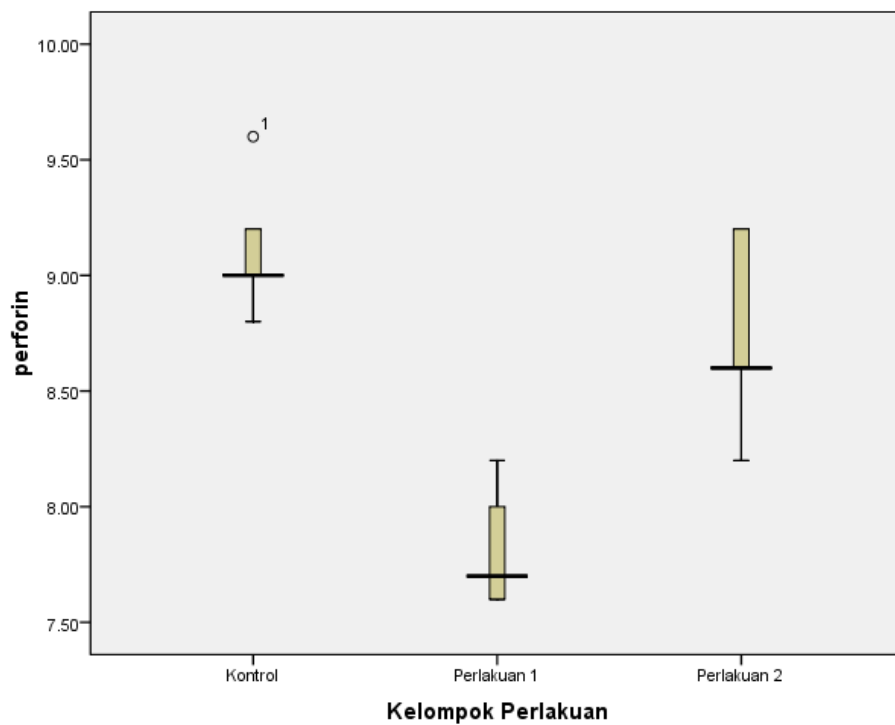
### **LAMPIRAN 3. ETHICAL CLEARANCE**

## LAMPIRAN 4. ANALISIS STATISTIK

Tests of Normality

Kelompok Perlakuan	Kolmogorov-Smimov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
perforin Kontrol	.308	6	.077	.857	6	.178
Perlakuan 1	.285	6	.138	.831	6	.110
Perlakuan 2	.299	6	.100	.851	6	.161

a. Lilliefors Significance Correction

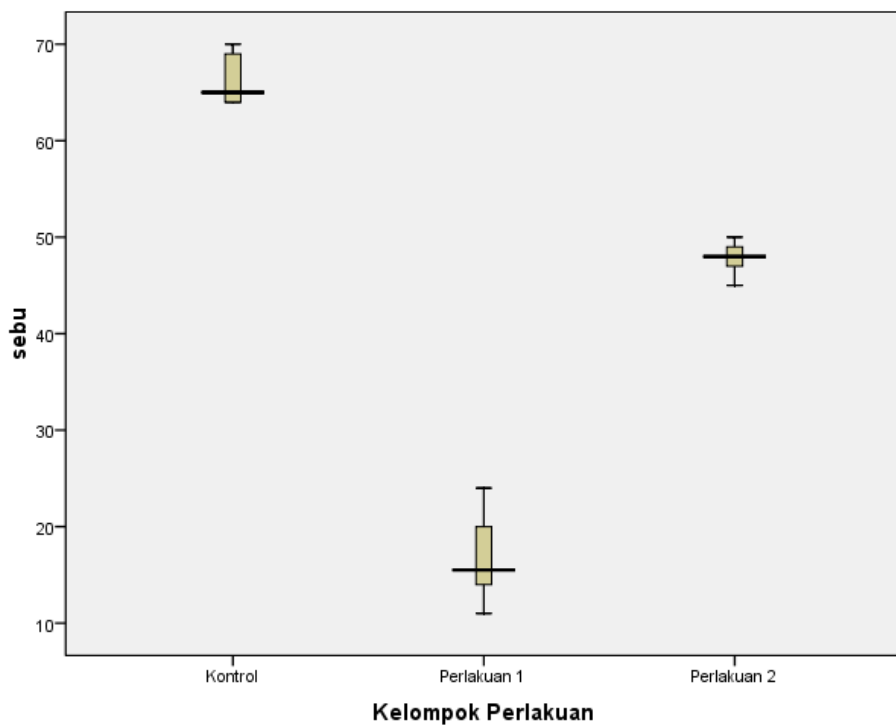


**Tests of Normality**

Kelompok Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
sebu Kontrol	.288	6	.132	.803	6	.062
Perlakuan 1	.214	6	.200*	.954	6	.775
Perlakuan 2	.205	6	.200*	.961	6	.830

a. Lilliefors Significance Correction

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



## Oneway

### Descriptives

perforin								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	6	9.1000	.27568	.11255	8.8107	9.3893	8.80	9.60
Perlakuan 1	6	7.8000	.25298	.10328	7.5345	8.0655	7.60	8.20
Perlakuan 2	6	8.7333	.39328	.16055	8.3206	9.1461	8.20	9.20
Total	18	8.5444	.63545	.14978	8.2284	8.8604	7.60	9.60

### Test of Homogeneity of Variances

perforin

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.898	2	15	.428

### ANOVA

perforin

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.391	2	2.696	27.443	.000
Within Groups	1.473	15	.098		
Total	6.864	17			

### Multiple Comparisons

perforin

Bonferroni

(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Perlakuan 1	1.30000*	.18094	.000	.8126	1.7874
	Perlakuan 2	.36667	.18094	.183	-.1207	.8541
Perlakuan 1	Kontrol	-1.30000*	.18094	.000	-1.7874	-.8126
	Perlakuan 2	-.93333*	.18094	.000	-1.4207	-.4459
Perlakuan 2	Kontrol	-.36667	.18094	.183	-.8541	.1207
	Perlakuan 1	.93333*	.18094	.000	.4459	1.4207

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

### Descriptives

sebu	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Kontrol	6		
Perlakuan 1	6	16.67	4.719	1.926	11.71	21.62	11	24
Perlakuan 2	6	47.83	1.722	.703	46.03	49.64	45	50
Total	18	43.56	21.253	5.009	32.99	54.12	11	70

### Test of Homogeneity of Variances

sebu

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.108	2	15	.074

**ANOVA**

sebu					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7515.444	2	3757.722	345.803	.000
Within Groups	163.000	15	10.867		
Total	7678.444	17			

**Multiple Comparisons**

sebu

Bonferroni

(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Perlakuan 1	49.500*	1.903	.000	44.37	54.63
	Perlakuan 2	18.333*	1.903	.000	13.21	23.46
Perlakuan 1	Kontrol	-49.500*	1.903	.000	-54.63	-44.37
	Perlakuan 2	-31.167*	1.903	.000	-36.29	-26.04
Perlakuan 2	Kontrol	-18.333*	1.903	.000	-23.46	-13.21
	Perlakuan 1	31.167*	1.903	.000	26.04	36.29

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.