

**PENGARUH PEMBERIAN *ECHINACEA PURPUREA*
TERHADAP PRODUKSI TNF- α MAKROFAG DAN
INDEKS APOPTOSIS SEL TUMOR MENCIT C3H
DENGAN ADENOKARSINOMA MAMMAE YANG
MENGALAMI STRESS**

***THE EFFECT OF ECHINACEA PURPUREA ON
MACROPHAG TNF- α PRODUCTION AND CELL TUMOUR
APOPTOTIC INDEX OF
ADENOCARSINOMA MAMMAE C3H MICE WITH STRESS***



Tesis

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

ABRAAR HS KUDDAH

**PROGRAM PASCA SARJANA
MAGISTER ILMU BIOMEDIK
DAN
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I
ILMU BEDAH
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2009**

Tesis

**PENGARUH PEMBERIAN ECHINACEA PURPUREA
TERHADAP PRODUKSI TNF- α MAKROFAG DAN
INDEKS APOPTOSIS SEL TUMOR MENCIT C3H
DENGAN ADENOKARSINOMA MAMMAE YANG
MENGALAMI STRESS**

Disusun oleh

ABRAAR HS KUDDAH

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji dan dinyatakan telah memenuhi syarat
untuk diterima

Menyetujui :
Komisi Pembimbing

Pembimbing I

Pembimbing II

dr. Djoko Handojo, SpB, SpB(K)Onk
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(K)
NIP. 131 757 921

DR.dr.WinartoSpMK,SpM(K)
NIP. 130 675 157

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, 14 Pebruari 2009

Penulis

RIWAYAT HIDUP SINGKAT

A. IDENTITAS

Nama : dr. ABRAAR HS KUDDAH
NIM Magister Biomedik : G4A003001
NIM PPDS I Bedah : G3A002085
Tempat / Tgl lahir : Malang, 24 Februari 1969
Agama : Islam
Jenis kelamin : Laki-laki
Istri : dr. Cholidah Hanum
Anak : Salman alfarisi Kuddah
Qouthrunada khoirunissa

B. Riwayat Pendidikan

1. SD Sukabumi Probolinggo, Jawa Tengah: Lulus tahun 1982
2. SMPK MaterDei Probolinggo, Jawa Tengah :Lulus tahun 1984
3. SMA Taruna leces Proboinggo, Jawa Tengah :Lulus tahun 1987
4. FK UNISSULA Semarang, JawaTengah :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 Purpurea* Terhadap Produksi TNF- α Makrofag Dan Indeks Apoptosis Sel Tumor Mencit C3H Dengan Kanker Payudara Yang Mengalami 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 Handojo, SpB, SpB(K)Onk 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, Direktur Pasca Sarjana Universitas Diponegoro Semarang.
3. DR.dr. Winarto, SpMK, SpM (K), Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro Semarang.
4. dr. Soejoto, SpKK(K), Dekan Fakultas Kedokteran 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, SpB(K)Onk, Ketua Bagian Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP dr. Kariadi Semarang.
7. dr. Sidharta Darsojono, SpB, SpU (K), 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 Y, SpPA(K),Ahli Patologi Anatomi RS.Dr Kariadi /FK UNDIP Semarang
10. Tim penguji dan nara sumber yang telah dengan sabar berkenan memberi masukan, arahan dalam penelitian dan penulisan tesis ini.
11. Para Konsulan Bag Bedah RS. Dr Kariadi/FK UNDIP yang telah dengan sabar berkenan memberi masukan ,arahan dalam penelitian dan tesis ini .
12. Semua rekan sejawat Residen Bedah FK UNDIP yang tak dapat disebutkan satu per satu.

13. Ucapan terima kasih khusus kepada Ayahanda tercinta Alm Dr H HS Kuddah dan ibunda tercinta Luluk Afrida ,ayah angkat tercinta H Usman Said B,dan mertua saya,kakakku Dra.ec Hevi Hanifa Rosid SE,istriku tercinta dr Cholidah hanum dan Anak-anakku tersayang Salman Al Farisi Kuddah dan Qouthrunada khoirunissa, yang telah memberikan motivasi , suri tauladan serta 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,14 Pebruari 2009

Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|---|------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| LEMBAR PENGESAHAN..... | ii |
| PERNYATAAN | iii |
| RIWAYAT HIDUP | iv |
| KATA PENGANTAR | v |
| DAFTAR ISI | vii |
| DAFTAR TABEL | xi |
| DAFTAR GAMBAR | xii |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xiii |
| ABSTRAK | xiv |
| <i>ABSTRACT</i> | xv |
| BAB 1. Pendahuluan..... | 1 |
| 1.1. Latar Belakang | 1 |
| 1.2. Rumusan Masalah..... | 4 |
| 1.3. Tujuan dan Manfaat Penelitian..... | 5 |
| 1.3.1. Tujuan Umum | 5 |
| 1.3.2. Tujuan Khusus | 5 |
| 1.3.3. Manfaat Penelitian | 5 |
| 1.4. Orisinalitas | 6 |

| | |
|---|----|
| BAB 2. Tinjauan Pustaka | 7 |
| 2.1. Kanker payudara..... | 7 |
| 2.1.1. Anatomi dan Histologi | 7 |
| 2.1.2. Etiologi dan patogenesis | 7 |
| 2.1.3. Klasifikasi | 8 |
| 2.2. Respon imunologik terhadap sel tumor ganas..... | 9 |
| 2.2.1. Antigen tumor..... | 10 |
| 2.2.2. Peran makrofag dalam respon antitumor | 14 |
| 2.2.3. Peran biologik TNF- α | 15 |
| 2.2.4. Limfosit T sebagai efektor anti tumor..... | 15 |
| 2.2.5. Apoptosis..... | 18 |
| 2.3. Pengaruh stres terhadap respons imunitas seluler | 21 |
| 2.4. Echinacea sp sebagai imunostimulator | 25 |
| 2.4.1. Latar belakang echinacea sp | 25 |
| 2.4.2. Echinacea sebagai Immunostimulator | 29 |
| 2.4.3. Keamanan dan kemanjuran <i>echinacea</i> | 32 |
| 2.4.4. Dosis..... | 35 |
| BAB 3. Kerangka Konseptual dan Hipotesis | 36 |
| 3.1 Kerangka Teori | 36 |
| 3.2 Kerangka Konsep | 36 |
| 3.3 Hipotesis | 37 |

| | |
|---|----|
| BAB 4 . Metode Penelitian | 38 |
| 4.1 Rancangan Penelitian..... | 38 |
| 4.2 Populasi dan sampel | 39 |
| 4.2.1. Populasi | 39 |
| 4.2.2. Sampel | 39 |
| 4.2.3. Tempat Penelitian | 40 |
| 4.3 Variabel Penelitian..... | 40 |
| 4.3.1. Variabel bebas | 40 |
| 4.3.2. Variabel tergantung | 41 |
| 4.4 Definisi Operasional | 41 |
| 4.5 Bahan dan alat | 43 |
| 4.6. Prosedur pengumpulan data | 45 |
| 4.7. Alur kerja | 46 |
| 4.8. Prosedur-prosedur laboratorium | 46 |
| 4.8.1. Prosedur transplantasi tumor | 46 |
| 4.8.2. Prosedur pembuatan kultur limfosit dari cairan peritoneal | 47 |
| 4.8.3. Prosedur pemeriksaan TNF- α limfosit | 49 |
| 4.8.4. Prosedur pembuatan preparat histopatologi | 50 |
| 4.9. Analisa data | 52 |
| 4.10. Persyaratan etik | 52 |

| | |
|--|----|
| BAB 5. Hasil | 53 |
| 5.1. KadarTNF- α makrofag | 53 |
| 5.2. Indeks apoptosis | 54 |
| 5.3. Uji Statistik | 55 |
| BAB 6. Pembahasan | 58 |
| BAB 7. Simpulan dan Saran..... | 63 |
| 7.1. Simpulan | 63 |
| 7.2. Saran | 63 |
| Daftar Pustaka | 64 |
| Lampiran | 69 |

DAFTAR TABEL

| | |
|---|----|
| Tabel 1. Tumor antigen yang menstimulasi respon sel-T | 11 |
| Tabel-2. Nilai rata-rata hasil pengukuran produksi TNF- α pada tiap kelompok percobaan | 53 |
| Tabel-3. Nilai rata-rata hasil penghitungan indeks apoptosis pada tiap kelompok percobaan..... | 54 |
| Tabel-4. Uji Korelasi kadar TNF- α dan indeks apoptosis..... | 57 |

DAFTAR GAMBAR

| | | |
|------------|---|----|
| Gambar 1. | Reaksi immune <i>T-Cell mediated</i> | 17 |
| Gambar 2. | Tahapan sitolitik sel target oleh CTLs..... | 18 |
| Gambar 3. | Jalur Kematian Sel Target yang dipengaruhi oleh CTL/NK..... | 19 |
| Gambar 4 | Jalur Apoptosis Sel Target yang dipengaruhi oleh reseptor CD95/Fas | 21 |
| Gambar 5. | Mekanisme yang terjadi pada stres dan sistem imun | 23 |
| Gambar 6. | Pengaruh Echinacea terhadap makrofag | 29 |
| Gambar 7. | <i>Boxplot</i> kadar TNF- α | 54 |
| Gambar 8. | <i>Boxplot</i> Indeks apoptosis | 55 |
| Gambar 9. | Hasil <i>Post Hoc test</i> kadar TNF- α dengan uji <i>Bonferroni</i> | 56 |
| Gambar 10. | Hasil <i>Post Hoc test</i> indeks apoptosis dengan uji <i>Bonferroni</i> | 57 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|---|----|
| Lampiran Pewarnaan HE sel tumor payudara dengan pembesaran 100X..... | 69 |
| Lampiran Pewarnaan HE sel tumor payudara dengan pembesaran 400X | 69 |
| Lampiran <i>Apoptotic Bodies</i> | 70 |
| Lampiran <i>Apoptotic Bodies</i> | 70 |
| Lampiran Apoptotic body dengan inti yang fragmented | 71 |
| Lampiran <i>ELISA MICROPLATE READER</i> untuk membaca absorbansi kadar TNF- α | 71 |
| Lampiran TNF- α ELISA Kit untuk mencit | 72 |

ABSTRAK

Latar belakang : *Echinacea sp* merupakan salah satu imunostimulator yang dapat meningkatkan imunitas seluler, yang telah tersedia di pasaran. Salah satu respon imunitas seluler yang berguna dalam perondaan sel kanker adalah kadar TNF- α makrofag dan respons terhadap perondaan sel kanker dilihat dari indeks apoptosis sel tumor.

Tujuan Penelitian: Membuktikan adanya perbedaan kadar TNF- α makrofag dan indeks apoptosis sel tumor antara yang diberi *Echinacea sp* dan yang tidak dan adakah hubungan antara produksi TNF- α dengan indeks apoptosis jaringan tumor.

Metoda : Dilakukan penelitian *post test only control group design* pada hewan coba. Sampel 18 ekor mencit C3H yang diinokulasi tumor, dibagi 3 kelompok yang terbagi K-P1-P2, pada P1 diberikan diet standart dan stres sedangkan P2 diberikan diet standard, *Echinacea sp* 0,195 mg/gramBB/hari dan stres. Analisis statistik dengan menggunakan uji *One Way ANOVA* dan *Post Hoc Bonferoni Test*.

Hasil : Didapatkan bahwa semua kelompok mempunyai perbedaan bermakna pada kadar TNF- α makrofag ($p=0,001$) dan indeks apoptosis sel tumor ($p<0,001$). Uji beda masing-masing *kelompok* pada kadar TNF- α makrofag menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,001$) antara (K) ($12,034 \pm 0,27$) dan (P1) ($11,384 \pm 0,18$), dan ($p<0,001$) antara (P1) ($11,384 \pm 0,18$) dan (P2) ($11,812 \pm 0,25$). Tidak ada perbedaan yang bermakna antara kelompok (K) dengan kelompok (P2) dengan nilai ($p=0,077$). Uji beda masing-masing kelompok indeks apoptosis menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p<0,001$) antara kelompok (K) ($10,033 \pm 0,37$) dan (P1) ($6,92 \pm 0,65$), ($4,848 \pm 0,169$). Sedangkan antara (K) dengan (P2) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,080$). Dengan uji Pearson didapatkan korelasi positif kuat ($0,695$) yang bermakna ($p=0,001$) antara indeks apoptosis dengan ekspresi TNF- α .

Simpulan : Terdapat peningkatan yang signifikan dan korelasi dari ekspresi TNF- α dengan indeks apoptosis pada mencit yang diberi *echinacea sp* dibanding yang tidak diberikan.

Kata kunci : *Echinacea sp*, Kadar TNF- α makrofag, Indeks apoptosis, adenokarsinoma mammae, stres

ABSTRACT

Background: *Echinacea Sp* is one of immunostimulator which could increases cellular immunity, that has already available in market. Patient who suffers breast carcinoma that being stress, the immune response would shift to humoral immunity. One of sellular immunity response that usefull in inhibiting cancer cells is TNF- α macrophage and responses to cancer cells inhibitor could been looked at the apoptosis index of tumour cancer .

Objectives: To prove the difference of TNF- α macrophage rate and the apoptosis index of tumour cancer between the group which given *Echinacea Sp* and the group which not given and are there a correlation between TNF- α production with the apoptosis index of tumour cancer.

Methods: Research using post test only control group design was done to trial animal. Sample 18 mice C3H which was inoculated by tumour, divided into 3 groups that was divided as K1-P1-P2. P1 was given a standard diet and stress, P2 was given a diet standard, *Echinacea sp* 0,195 mg/gramBB/hari and stress. The treatment was donefor 10 days. Statistical analyzis uses One Way ANOVA Test and Post Hoc Bonferoni Test.

Results: There was a significant difference to all groups in TNF- α Macrophage rate ($p=0,001$) and the apoptosis index of tumour cancer ($p=0,001$). Post Hoc Bonferoni test to TNF- α Macrophage rate variable shows that there is a significant difference($p=0,001$) between Control group K (12,034 \pm 0,27) and P1(11,384 \pm 0,18) and there are a significant difference ($p<0,001$) between P1 group (11,384 \pm 0,18) and P2 group (11,812 \pm 0,25). There wasn't a significant difference between K group with P2 group ($p=0,077$). Post Hoc Bonferoni test on index apoptotic variable shows that there are significant difference ($p<0,001$) between K group (10,033 \pm 0,37) and P1 group (6,92 \pm 0,65) and has become significant difference ($p<0,001$) between P1 group (6,92 \pm 0,65) and P2 group (4,848 \pm 0,169). And there wasn't a significant difference between K group and P2 group ($p= 0,080$). With Pearson test there is a significantly($p=0,001$) positive correlation (0.695) between TNF- α expression with apoptotic index of tumor cell.

Conclusions: There is significantly difference and correlation between TNF- α Macrophage level and the apoptosis index of tumour cancer in a mice which is given *Echinacea sp*. than which not given.

Key words: *Echinacea Sp.*, TNF- α Macrophage rate, apoptotic index, adenocarcinoma mammae, stress

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Keganasan yang sering ditemukan diseluruh dunia adalah kanker payudara. Di seluruh dunia diperkirakan lebih dari 1,2 juta jiwa menderita kanker payudara, di Amerika sekitar 215.990 wanita didiagnosa menderita ca mammae invasive. Pada tahun 2000, kanker payudara diperkirakan menjadi penyebab 189.000 kematian di negara maju, dan 184.000 kematian di Negara berkembang. (16% dan 12% dari seluruh kematian pada wanita yang disebabkan oleh kanker), dengan insidensi relatif tinggi yaitu sebesar 23,1 per 100.000 wanita¹. Di Asia tenggara pada tahun 2000 didapatkan 55.907 kasus baru dan 24.967 kasus meninggal². Kanker payudara banyak diderita oleh wanita dan sangat jarang ditemukan pada laki-laki. Sekitar 600.000 kasus kanker payudara baru didiagnosa setiap tahun dan 350.000 kasus diantaranya ditemukan dinegara maju, sedangkan 250.000 kasus lainnya ditemukan di negara berkembang³. Data Badan Registrasi Kanker Ikatan Ahli Patologi Indonesia (BRK-IAPI) 1994 memperlihatkan bahwa persentase kanker payudara wanita menduduki urutan kedua tertinggi (11,77%) setelah kanker rahim (17,70%) dari semua kasus tumor di seluruh senter Patologi Anatomi di Indonesia, dan merupakan 17,11% dari keseluruhan insiden kanker pada wanita setelah kanker leher rahim (24,14%)⁴. Di Semarang pada tahun 2001, ditemukan kasus kanker payudara sebanyak 769 kasus dan insiden ini berada pada urutan tertinggi kedua setelah kanker mulut rahim. Insiden puncak pada kelompok

umur 45-54 tahun ⁵. Di Amerika pada tahun 1993 angka kejadian kanker payudara adalah 28 per 100.00 populasi ⁶.

Penyakit kanker umumnya dipandang oleh masyarakat sebagai penyakit yang tidak dapat disembuhkan dan berakhir dengan kematian disertai dengan penderitaan hebat. Asumsi masyarakat yang demikian ini akan sangat menimbulkan stress bagi penderitanya. Stress 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 lymfoid. Efek sistemik dari glukokortikoid dan katekolamin ini mempengaruhi pengaturan sitokin tipe 1 dan tipe 2. Stress akan menurunkan produksi sitokin tipe 1 yang dibutuhkan dalam respon imunitas seluler terhadap tumor. ⁷ Oleh karena itu perlu suatu immunostimulator yang dapat meningkatkan respon imunitas seluler terhadap sel tumor, baik terhadap sel-sel efekturnya sendiri maupun sitokin yang mendapat sel-sel tumor, seperti sitokin *Tumor Necrotizing Factor* (TNF)

Sel imun khususnya limfosit T sitotoksik (CTL), Sel NK (*Natural Killer*) dan makrofag berperan dalam *immuno survailance* terhadap sel kanker. Setelah pengenalan sel kanker sebagai sel asing, sel-sel imun tersebut akan menghancurkan sel kanker ^{8,9,10}. 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 ^{13,25,44}.

Echinacea sp merupakan immunostimulator yang banyak dan mudah dicari di pasaran, baik dalam bentuk obat maupun minuman suplemen yang dapat diperoleh dengan harga murah. *Echinacea* dapat memacu makrofag untuk menghasilkan sitokin yang akan membantu regulasi sistem imun. Pada hasil kultur makrofag yang mendapat stimulasi *echinacea* menunjukkan peningkatan produksi sitokin dibandingkan dengan yang tidak distimulasi.⁸ Sitokin yang dihasilkan makrofag darah perifer mencit yang mendapat *Echinacea purpurea* akan mengaktifasi sel T helper untuk berproliferasi. Dilaporkan juga bahwa aktivasi makrofag yang berhubungan dengan aktivasi limfosit T sekunder akan meningkatkan produksi TNF dan menstimulasi sel-sel T sitotoksik.⁹ Sel-sel T sitotoksik (CTL) yang aktif ini akan mempunyai peran penting dalam perondaan tubuh terhadap sel-sel tumor. CTL akan menginduksi apoptosis dari sel-sel tumor. 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- α , IL-1, IL-5 dan IL-10.^{41,42}

Stress sangat berpengaruh terhadap sistem imun tubuh melalui mekanisme neuroendokrion. Pada kondisi stress akan terjadi penurunan respon sistem imun⁴³.

Berdasarkan hal tersebut diatas diperkirakan pemberian *Echinacea* pada penderita kanker payudara yang mengalami 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 penelitian ini dilakukan pada hewan coba mencit C3H. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan landasan untuk penelitian lebih lanjut pada manusia.

1.2. Rumusan Masalah

Melihat latar belakang tersebut diatas, maka dapat diambil perumusan masalah sebagai berikut :

1. Apakah ada perbedaan kadar TNF serum antara mencit C3H adenokarsinoma mamma, mencit C3H adenokarsinoma mamma yang mengalami stress, dan mencit C3H adenokarsinoma mamma yang mengalami stress tetapi mendapatkan suplemen *Echinacea*?
2. Apakah ada perbedaan indeks apoptosis tumor antara mencit C3H adenokarsinoma mamma, mencit C3H adenokarsinoma mamma yang mengalami stress, dan mencit C3H penderita adenokarsinoma mamma yang mengalami stress tetapi mendapatkan suplemen *Echinacea*?
3. Apakah ada korelasi antara produksi TNF dengan Indeks apoptosis jaringan tumor?

1.3. Tujuan Dan Manfaat Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Membuktikan adanya Pengaruh kadar TNF dan indeks apoptosis sel-sel tumor serta menganalisa hubungan pemberian imunostimulator terhadap indeks apoptosis pada adenokarsinoma mamma mencit C3H yang mengalami stress

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Menganalisis perbedaan kadar TNF serum antara kelompok mencit adenokarsinoma mamma yang mengalami stress dan mencit adenokarsinoma mamma yang mengalami stress tetapi mendapatkan suplemen *Echinacea sp.*
2. Menganalisis perbedaan indeks apoptosis tumor antara mencit adenokarsinoma mamma yang mengalami stress dan mencit adenokarsinoma mamma yang mengalami stress tetapi mendapatkan suplemen *Echinacea sp.*
3. Membuktikan adanya korelasi antara produksi TNF dengan Indeks Apoptosis jaringan tumor.

1.3.3. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan informasi mengenai pentingnya penggunaan imunostimulator pada penderita kanker terutama yang mengalami stress sehingga tidak akan menimbulkan dampak lebih

lanjut dengan menurunnya sistem kekebalan seluler akibat stress. Penelitian ini juga bermaksud memberikan kontribusi terhadap perkembangan ilmu di bidang imunologi, herbal medicine dan khususnya di bidang onkologi.

Hasil penelitian ini diharapkan juga dapat memberikan landasan untuk penelitian lebih lanjut pada manusia.

1.4. Orisinalitas

| Penulis | Judul / penerbit | Hasil |
|---|---|--|
| Burger R, Torres A, Warren R, Caldwell V, Hughes B. | <i>Echinacea-induced cytokine production by human macrophages.</i> Int J Immunopharmacol. 1997; 19(7): 371-9 ⁸ . | <i>Echinacea sp</i> dapat meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag alveoler. Disamping itu juga didapatkan peningkatan TNF- α , <i>interferon-γ</i> dan pelepasan <i>Nitric Oxide</i> (NO) makrofag alveoler yang dirangsang dengan <i>Lipopolisakarida</i> (LPS). |
| Mishima S, Saito K, Maruyama H, Inoue M, Yamashita T, Ishida T, Gu Y. | <i>Antioxidant and immuno-enhancing effects of Echinacea purpurea.</i> Biol Pharm Bull. 2004;27(7):1004-9 ⁹ | Kultur makrofag yang mendapat stimulasi <i>echinacea sp</i> menunjukkan efek antiviral dibandingkan dengan yang tidak distimulasi. |
| See D, Broumand N, Sahl L, Tilles J. | <i>In vitro effects of echinacea sp and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or AIDS patients.</i> Immunopharmacology. Jan 1997; 35(3): 229-35 ⁴⁷ . | Ekstrak <i>echinacea sp</i> secara nyata akan meningkatkan fungsi imun yang imunitas selulernya tertekan seperti pada AIDS |
| Bratman S, Kroll D. | <i>Everything You Need to Know About Echinacea and Immunity.</i> Natural Health Bible. Prima Publishing. 1999: 179-81 ⁵² . | 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. | <i>Natural Killer cells from aging mice treated with extracts from echinacea sp purpurea are quantitatively and functionally rejuvenated.</i> Exp Gerontol. 2000 Aug;35(5): 627-39 ⁵³ . | <i>E.purpurea</i> dengan komponen-komponen fitokimianya dapat merangsang produksi sel-sel NK demikian juga fungsi sitolitiknya pada binatang coba yang mengalami penuaan |
| Goel V, Chang C, Slama J, Barton R, Bauer R, Gahler R, Basu T. | <i>Echinacea sp stimulates macrophage function in lung and spleen of normal rats.</i> J Nutr Biochem. 2002;13(8):487 ⁵⁴ | <i>Echinacea purpurea</i> lebih meningkatkan sistem imunologis subset CD ⁴⁺ dan CD ⁸⁺ dibanding sel-sel <i>T helper</i> dan sel <i>T supresor</i> sebagaimana hasil penelitiannya dan ini menunjukkan adanya peningkatan respon imunitas seluler |

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kanker payudara

2.1.1. Anatomi dan Histologi

Kelenjar ini khas untuk golongan mamalia. Jumlah kelenjar berbeda tergantung jenis spesies. Kelenjar payudara merupakan kelenjar *tubuloalveolar* terdiri 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*¹⁰.

2.1.2. Etiologi dan patogenesis

Ada 3 pengaruh penting pada kanker payudara :

a. Faktor genetik

Ada faktor turunan pada suatu keluarga yang terkena kanker payudara. kelainan ini diketahui terletak dilokus kecil di *kromosom* 17q21 pada kanker payudara yang timbul saat usia muda^{11,12,13,14}.

b. Hormon

Kelebihan hormon *estrogen endogen* atau lebih tepatnya terjadi ketidak seimbangan hormon terlihat sangat jelas pada kanker payudara. Berbagai bentuk *growth promoters (transforming growth factor-alpha / epithelial growth factor, platelet- derived growth factor), fibroblast growth factor* dan *growth inhibitor* disekresi oleh sel kanker payudara manusia. Banyak penelitian menyatakan bahwa *growth promoters* terlibat dalam mekanisme

autokrin dari tumor. Produksi GF tergantung pada hormon *estrogen*, sehingga Interaksi antara hormon di sirkulasi , reseptor hormon di sel kanker dan GF autokrin merangsang sel tumor menjadi lebih *progresif*.^{10,12,15}

c. Faktor lingkungan

Pengaruh lingkungan diduga karena berbagai faktor antara lain : alkohol, diet tinggi lemak, kecanduan minum kopi, dan infeksi virus. Hal tersebut mungkin mempengaruhi *onkogen* dan gen supresi tumor dari kanker payudara.^{15,16}

2.1.3. Klasifikasi

Berdasarkan gambaran histologis, WHO membuat klasifikasi kanker payudara sebagai berikut.

a. Kanker Payudara Non Invasif

1. Karsinoma intraduktus non invasif
2. Karsinoma lobular *in situ*

b. Kanker Payudara Invasif

1. Karsinoma duktus invasif
2. Karsinoma lobular invasif
3. Karsinoma musinosum
4. Karsinoma meduler
5. Karsinoma papiler invasif
6. Karsinoma tubuler
7. Karsinoma adenokistik

8. Karsinoma apokrin

Karsinoma ini didominasi dengan sel yang memiliki sitoplasma *eosinofilik*, sehingga menyerupai sel *apokrin* yang mengalami *metaplasia*. Bentuk karsinoma apokrin dapat ditemukan juga pada jenis karsinoma payudara yang lain¹⁷.

Berdasarkan gambaran gejala klinik, *Klasifikasi TNM* menurut *International Union Against Cancer (UICC)*¹⁸ Apabila dilihat dari derajat histologi, adenokarsinoma payudara menurut "*Nottingham Modification of The Bloom- Richardson System*"^{19,20,21}

2.2. Respon imunologik 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.^{16,22} *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*.^{12,16,22,23}

Induksi *limfosit* T dalam respon imun hampir selalu bersifat makrofag “dependent”. Makrofag berfungsi untuk memproses *imunogen* dan menyajikannya – sebagai *Antigen Presenting Cells* (APC) – ke limfosit T spesifik (*immune T cells*). Pada penelitian *in vitro* dapat terjadi ikatan limfosit T dengan makrofag. Ikatan limfosit T dengan makrofag sangat dipengaruhi oleh *imunogen*.^{10, 14, 20, 21, 24}

2.2.1. Antigen tumor

Meski tumor berasal dari jaringan tubuh sendiri, sel-selnya akan mengekspresikan molekul yang akan dikenali oleh *limfosit* B dan T sebagai benda asing. Protein asing pada permukaan sel tumor juga menjadi target sel NK. Sedangkan antigen tumor dapat dikelompokkan menjadi :

- Tumor-specific antigens (TSAs)

Adalah tumor antigen yang diekspresikan oleh sel tumor tetapi tidak diekspresikan oleh sel-sel normal. Dan bila antigen ini karakteristik untuk satu jenis tumor / satu clone tumor disebut Unique tumor antigen.

- Tumor-associated antigens (TAAs)

Bila tumor antigen juga diekspresikan oleh jaringan normal di dalam tubuh, antigen ini juga dapat menginduksi respon imun tubuh, tetapi biasanya tidak.

Antigen tumor biasanya diekspresikan berasosiasi dengan *Major Histocompatibility Complex* kelas I (*MHC* kelas I) yang akan dikenali oleh sel limfosit T CD8. Jadi sel tumor sendiri dapat menjadi *Antigen Presenting Cells* (APCs) dari antigennya sendiri. Dan apabila protein antigen ini terlepas ke medium ekstraseluler bersama sel tumor yang mati atau sel tumor yang utuh akan

diendositosi oleh APCs dan diekspresikan sebagai MHC tipe II yang akan dikenali oleh limfosit T Helper CD4. ^{14,16,22,24}

Antigen tumor yang diekspresikan bisa berasal dari anomali sintesa protein maupun anomali dari sintesa protein tumor supresor pada sel maligna. Beberapa tumor antigen yang menstimulasi respon sel-T antara lain : (tabel 1)

Tabel-1. Tumor antigen yang menstimulasi respon sel-T ¹⁶.

| Kategori | Contoh |
|---|--|
| Produk Onkogen | p21^{ras} protein (10% karsinoma pada manusia) p210 (chronic myelogenous leukemia) HER-2/neu , merupakan over ekspresi dari gen normal (berbagai karsinoma) |
| Produk dari gen tumor-supresor yang mengalami mutasi | p53 (\approx 50% tumor-tumor pada manusia) |
| Produk dari gen virus yang berkaitan dengan keganasan | SV40T antigen HPV E6 dan E7 (karsinoma serviks pada manusia) EBNA-1 (limfoma Burkitt's, dan karsinoma nasofaring) |

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. Respon imun diawali dengan peristiwa masuknya *imunogen* dan penyajian *imunogen* tersebut ke reseptor dari limfosit. ^{12,15,16,22,24.}

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.¹² 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 tersebut¹⁶. Limfosit T *helper* tersebut juga menghasilkan *interleukin* lain yang dapat menginduksi berbagai sel lain seperti limfosit B, makrofag, *prekursor* limfosit T sitotoksik, dan sel endotelial.^{12,15,16,22,24}

c. Fase Efektor

Fase Efektor dari respons imun adalah tahap pada waktu limfosit telah teraktifkan oleh Imunogen dan dalam keadaan yang dapat berfungsi mengeliminasi imunogen tersebut. Pada fase Efektor, imunogen tidak lagi berperan kecuali sebagai suatu target untuk dihancurkan^{12,15,16,23,24}

Fungsi sistem imun adalah fungsi protektif dengan mengenal dan menghancurkan sel-sel abnormal itu sebelum berkembang menjadi tumor atau membunuhnya kalau tumor itu sudah tumbuh. Peran sistem imun ini disebut *immune surveillance*, oleh karena itu maka sel-sel Efektor seperti limfosit B,

T-sitotoksik dan sel NK harus mampu mengenal antigen tumor dan memperantarai/menyebabkan kematian sel-sel tumor.^{12,16,25}

Beberapa bukti yang mendukung bahwa ada peran sistem imun dalam melawan tumor ganas diperoleh dari beberapa penelitian, diantaranya yang mendukung teori itu adalah: 1) Banyak tumor mengandung infiltrasi sel-sel mononuklear yang terdiri atas sel T, Sel NK dan Makrofag; 2) tumor dapat mengalami regresi secara spontan; 3) tumor lebih sering berkembang pada individu dengan *imunodefisiensi* atau bila fungsi sistem imun tidak efektif; bahkan *imunosupresi* seringkali mendahului pertumbuhan tumor; 4) dilain pihak tumor seringkali menyebabkan *imunosupresi* pada penderita. Bukti lain yang juga mendukung bahwa tumor dapat merangsang *sistem* imun adalah ditemukannya limfosit berproliferasi dalam kelenjar getah bening yang merupakan *draining sites* dari pertumbuhan tumor disertai peningkatan ekspresi *MHC* dan *Interseluler adhesion molecule* (ICAM) yang mengindikasikan sistem imun yang aktif.^{12,16}

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^{16,23,25} Hubungan antara banyaknya limfosit yang ditemukan diantara kelompok sel kanker secara histologi dengan prognosis penderita telah ditunjukkan pada kanker leher rahim.²⁶

Sel imun yang berada disekitar sel kanker yang berperan dalam perondaan 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 ^{12,13,16,25}

Sel CTL dan sel NK melakukan cara sitotoksitas yang sama yaitu dengan mengeluarkan perforin, sedangkan makrofag menggunakan cara fagositosis ^{10,16,14,24}. 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 ^{12,16}.

Komponen efektor pada sistem imun yang memiliki kemampuan bereaksi dengan sel tumor ialah limfosit T, *antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC), sel NK dan Makrofag. ^{12,13,14,24}

2.2.2. 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 *T helper*, maupun bertindak langsung sebagai efektor dengan melisis sel tumor.

Makrofag yang berperan dalam mekanisme tersebut adalah makrofag aktif yaitu makrofag yang telah diaktifasi oleh *Macrofag Activating Factors* (MAF), suatu sitokin yang dihasilkan limfosit T yang distimulasi antigen. Makrofag yang tidak aktif telah dibuktikan tidak memiliki kemampuan melisis sel tumor.

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 antara lain IL-12 dan *Tumor Necrosis Factor* (TNF). IL-12 berperan memacu proliferasi dan aktivasi sel T CD4+, sel T CD8+ serta sel-NK. TNF- α , sesuai namanya mampu membunuh sel tumor melalui cara : 1) TNF- α berikatan dengan reseptor FAS permukaan dari sel tumor dan memicu apoptosis, 2) TNF- α dapat menyebabkan nekrosis dari sel tumor dengan cara memobilisasi berbagai respon imun tubuh^{15,16,22,23,25}.

2.2.3. Peran biologik TNF- α

TNF- α merupakan *nonglycosylated transmembran protein* dengan berat molekul 25 kD, dalam sirkulasi dalam bentuk homotrimer stabil dengan berat molekul 51 kD. Dalam kinerjanya sebagai antitumor dikaitkan dengan induksi apoptosis sel tumor melalui reseptor TNF- α pada permukaan sel tumor TNF- α juga akan mengakibatkan *Shwartzman reaction* lokal yaitu kerusakan dinding pembuluh darah akibat TNF yang mekanismenya belum diketahui, yang akan menimbulkan kerusakan *vascular bed* di mana terdapat sejumlah pembuluh darah yang mensuplai pertumbuhan tumor¹⁶.

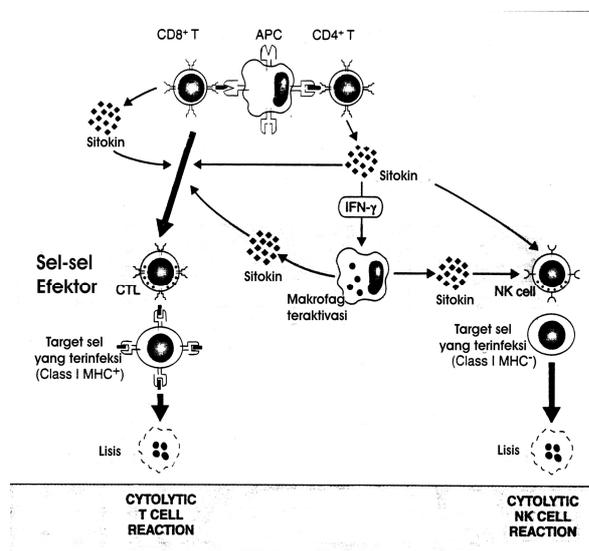
2.2.4. Limfosit T sebagai Efektor anti tumor

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), mengaktifasi 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 mengaktifasi sel T-*helper* terutama subset Th1 untuk mensekresi *limfokin* IFN- γ dan TNF- α 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)²²⁻²⁸.

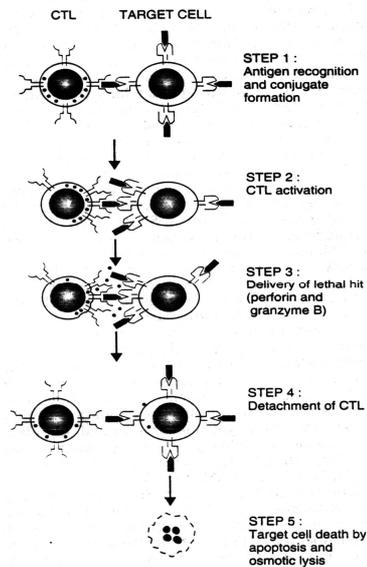
Pada banyak penelitian terbukti bahwa sebagian besar sel efektor yang berperan dalam mekanisme anti tumor adalah sel T CD8, yang secara fenotip dan fungsional identik dengan CTL yang berperan dalam pembunuhan sel yang terinfeksi virus atau sel *alogenik*. CTL dapat melakukan fungsi *surveillance* dengan mengenal dan membunuh sel-sel potensial ganas yang mengekspresikan peptida yang berasal dari protein seluler mutant atau protein virus onkogenik yang dipresentasikan oleh molekul MHC kelas I. Limfosit T yang menginfiltrasi jaringan tumor (*Tumor Infiltrating Lymphocyte* = TIL) juga mengandung sel CTL yang memiliki kemampuan melisis sel tumor. Walaupun respon CTL mungkin tidak efektif untuk menghancurkan tumor, peningkatan respon CTL merupakan cara pendekatan terapi antitumor yang menjanjikan dimasa mendatang. Sel T CD4⁺ pada umumnya tidak bersifat sitotoksik bagi tumor, tetapi sel-sel itu dapat berperan dalam respon antitumor dengan memproduksi berbagai sitokin yang diperlukan untuk perkembangan sel-sel CTL menjadi sel efektor. Di samping itu

sel T CD4⁺ yang diaktifasi oleh antigen tumor dapat mensekresi TNF dan IFN γ yang mampu meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I dan sensitivitas tumor terhadap lisis oleh sel CTL (Gambar 1). Beberapa tumor yang antigennya diekspresikan bersama dengan MHC kelas II dapat mengaktifasi sel CD4⁺ spesifik tumor secara langsung, yang lebih sering terjadi adalah bahwa APC professional yang mengekspresikan molekul MHC kelas II memfagositosis, memproses dan menampilkan protein yang berasal dari sel-sel tumor yang mati kepada sel T CD4⁺, sehingga terjadi aktivasi sel-sel tersebut. Proses sitolitik CTLs terhadap sel target dengan mengaktifkan penggunaan enzim Perforin dan Granzym, ada beberapa langkah proses sitolitik CTLs terhadap sel target (Gambar 2)²²⁻²⁸.



Gambar 1. Reaksi immune T-Cell mediated¹⁶.

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



Gambar 2. Tahapan sitolitik sel target oleh CTLs¹⁶.

(Dimodifikasi dari : Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology.

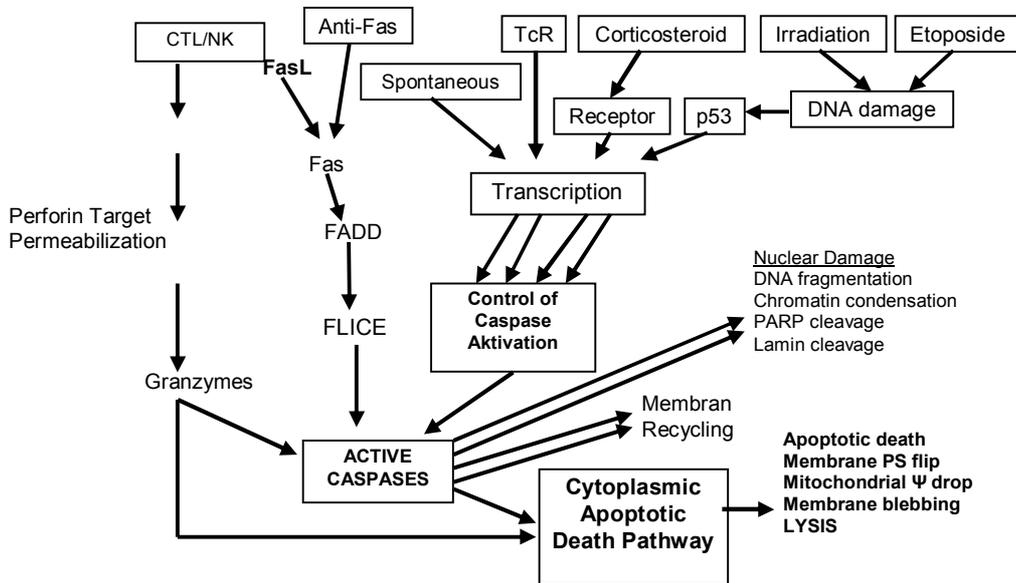
Philadelphia: WB Saunders Co. 1997 : 279)

2.2.5. Apoptosis

Apoptosis adalah suatu kematian sel yang terprogram atau *programmed cell death*. Sekali terjadi aktivasi akan menyebabkan reaksi enzimatik intraseluler. Enzym, protein, dan DNA akan terurai, dan tidak ada komponen intraseluler yang terdispersi ke ekstraseluler. Sel yang mengalami apoptosis akan mengeluarkan signal ke ekstraseluler berupa phospholipid pada membran selnya yang dapat dikenali oleh sel-sel imun, terutama makrofag.²⁷

Ada banyak stimulasi yang dapat menginduksi apoptosis. Stimulasi utama adalah agent kemoterapi, ultraviolet/radiasi, panas, *osmotic imbalance*, dan *Nitric Oxide*. Menurut jenis triger dan tipe selnya, ada banyak jalur signal untuk mengaktifasi apoptosis (Gambar 3). Yang akan kami sebutkan disini adalah apoptosis yang diinduksi oleh CTL dan sel-NK yang diinduksi baik oleh

nonsecretory induced, ligand-induced, dan secretory induced dengan granzyme melalui perantara sekresi perforin.



Gambar-3. Jalur Kematian Sel Target yang dipengaruhi oleh CTL/NK ²⁴

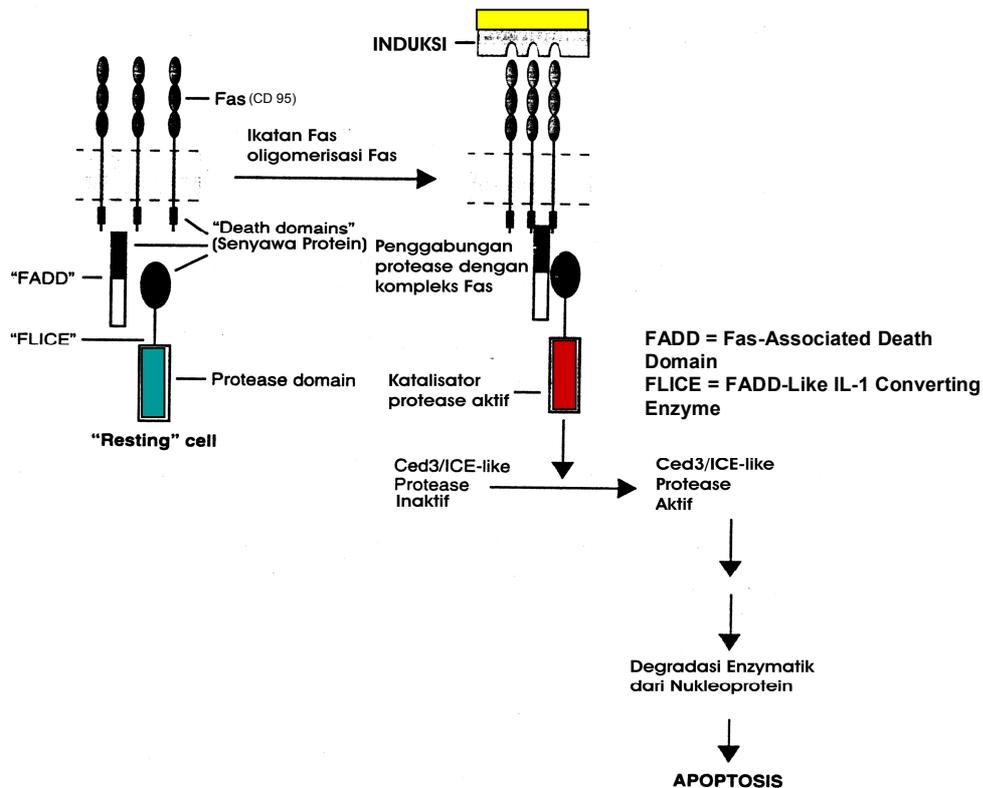
Kerusakan *DNA* dipicu oleh enzim caspase aktif, di mana caspase ini merupakan suatu molekul protein 10 dan 20 kD berupa *protease cysteine*. Saat ini sudah dikenal ± 12 jenis caspase. Protein target dari *caspase* ini adalah protein *DNA repair system* [seperti (ADP-ribose)-polymerase], protein struktural/sitoskeletal (seperti lamin, actin, cytokeratin, dll) , dan *onkoprotein* (terutama Rb protein). Yang terakhir diketahui, *caspase* juga akan mengaktifkan *Dnase* yang menyebabkan kerusakan DNA selama apoptosis. Sehingga yang akan terjadi adalah melisutnya organel dan inti sel. ^{27,28}

Caspase (terutama *caspase 8* dan *10*) dapat diaktifkan oleh granzyme maupun suatu katalisator *protease* yaitu *FLICE (FADD-Like IL-1 Converting*

Enzyme) yang berikatan oleh **FADD** (*Fas-Associated Death Domain*), pada reseptor *CD95/Fas* setelah kontak dengan *Fas ligand*. Pengaktifan *caspase* melalui reseptor *CD95/Fas* terjadi bila kontak dengan *Fas ligand*. *Fas ligand* ini bisa berasal dari *ekspresi protein antigen* dari CTL, sitokin *TNF*, ataupun *metabolit ligand* pada Fas reseptor seperti *polyphenol* yang terkandung dalam *tanaman obat* (gambar 4).^{16,27,28}

Aktifasi *secretory induce caspase* dilakukan oleh CTL dan sel-NK oleh granula sitotoksiknya yang berisi protein *pore-forming perforin* (cytolysin) dan *enzym famili* dari serine protease yang bernama granzyme sebagai senjata dari CTL/sel-NK. Granzyme ini terdiri dari granzyme A, granzyme B, C,D,E,F,G,H,K, dan M.¹⁶

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



Gambar-4. Jalur Apoptosis Sel Target yang dipengaruhi oleh reseptor CD95/Fas¹⁶

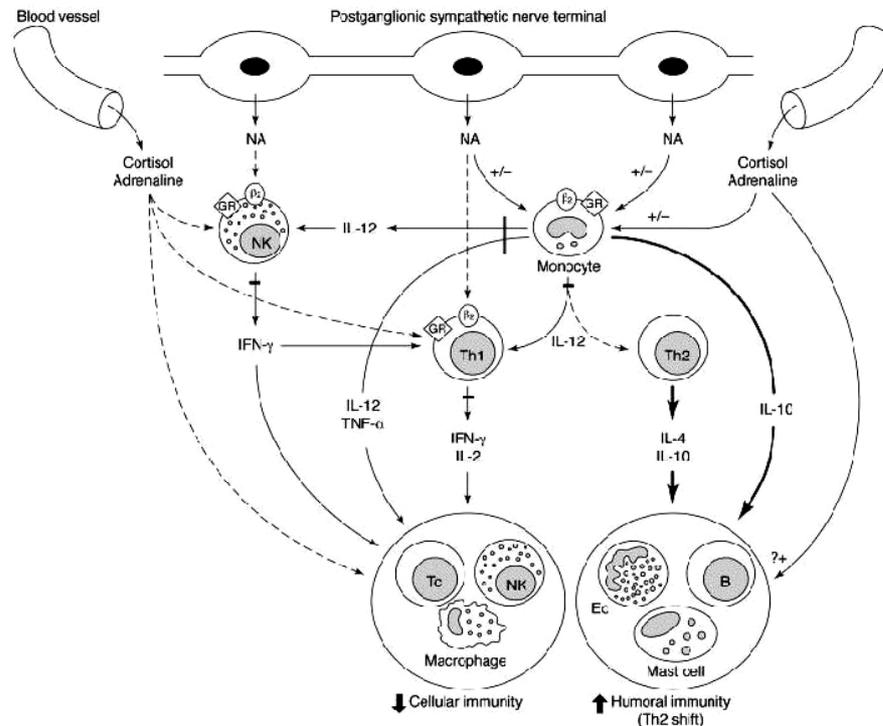
2.3. Pengaruh stress terhadap respon imunitas seluler

Dalam menghadapi stressor, terjadi perubahan-perubahan fisiologik yang membantu individu untuk melawan stress tersebut. Respon terhadap stress yang berjalan kronik melibatkan *Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis* (HPA Axis) dan *sympathetic-adrenal-medullary axis* (SAM Axis) dengan hasil akhir produksi hormon *glukokortikoid* dan *katekolamin* yang berjalan kronis. Reseptor *glukokortikoid* diekspresikan oleh bermacam-macam sel imun yang akan mengikat kortisol bekerjasama dengan fungsi NF- κ B yang mengatur produksi sitokin sel-sel imun. Reseptor *adrenergik* mengikat *epinefrin* dan *norepinefrin* dan mengaktifkan respon *cAMP* yang akan menginduksi transkripsi gen-gen yang mengkode bermacam-macam *sitokin*. Perubahan ekspresi gen diperantarai

hormon-hormon *glukokortikoid* sedangkan *katekolamin* dapat mengacaukan pengaturan fungsi imun. Sekarang terdapat banyak bukti baik dari penelitian hewan maupun manusia bahwa kekacauan sistem imun yang diakibatkan stress cukup berpengaruh terhadap kesehatan.^{29, 30,31}

Penelitian mengenai kekacauan sistem imun yang diakibatkan stress banyak menarik para peneliti dan klinisi dalam bidang psikoneuroimunologi. Bidang ini memfokuskan interaksi sistem saraf pusat (SSP), sistem endokrin dan sistem imun dan pengaruhnya terhadap kesehatan. Modulasi respon imun di SSP dipengaruhi jaringan signal-signal kompleks yang berfungsi melakukan komunikasi dua arah antara saraf, endokrin dan sistem imun. Dua jalur utama yang dapat merubah fungsi imun adalah *Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis* (HPA Axis) dan *sympathetic-adrenal-medullary axis* (SAM Axis).³¹

Stress 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 lymfoid. Efek sistemik dari glukokortikoid dan katekolamin ini mempengaruhi pengaturan sitokin tipe 1 dan tipe 2. Stresss akan menurunkan produksi sitokin tipe 1 yang dibutuhkan dalam menanggapi infeksi bakterial melalui respon imunitas seluler.^{7,30}



Gambar 5. Mekanisme yang terjadi pada stress dan sistem imun ⁷

(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

Hipotalamus menerima dan memonitor informasi lingkungan dan mengkoordinasikan respon melalui saraf dan hormon. Bagian emosi di otak juga memberikan informasinya ke hipotalamus. Melalui integrasi ini otak mengendalikan sekresi hormon dari glandula hypofise dan jaringan lain seperti glandula adrenal. Misalnya corticotropin releasing hormone (CRH) disekresikan oleh nukleus paraventrikular hipotalamus ke aliran darah porta hipofise dan akhirnya merangsang ekspresi adrenocorticotrophic hormone (ACTH) di glandula hipofise anterior. ACTH akan masuk dalam sirkulasi untuk mencapai glandula adrenal yang akhirnya akan menghasilkan hormon glukokortikoid (GC=

Glucocorticoid). Glukokortikoid akan mempengaruhi fungsi kardiovaskuler dan ginjal, metabolisme dan bersama-sama dengan sistem saraf mengatur respon kita terhadap lingkungan. Sebagai salah satu “*core stress response*”, produksi hormon GC dari korteks adrenal akan merangsang metabolisme glukosa untuk menyediakan energi yang dibutuhkan dalam melarikan diri atau melawan tantangan yang terjadi tiba-tiba. Akan tetapi bila aktivasi ini berjalan kronis justru akan menyebabkan efek yang buruk pada kesehatan dan memperberat penyakit yang sudah ada. Sejak tahun 1940 dan 1950an, hormon glukokortikoid banyak digunakan secara klinis karena efek yang sangat kuat dan tak terpisahkan sebagai anti inflamasi. Hormon glukokortikoid dapat mengatur bermacam-macam fungsi sel imunitas secara luas. Hormon ini dapat mengatur ekspresi sitokin, ekspresi kemotaktan, ekspresi molekul-molekul adhesi dan komunikasi sel-sel imun, proliferasi dan fungsi efektor.^{7,30,31}

Regulasi sistem imun pada keadaan stress juga dipengaruhi oleh katekolamin yang mengatur fungsi-fungsi imunologis seperti proliferasi sel, produksi sitokin dan antibodi, aktivitas sitolitik dan komunikasi sel.^{32,33} Katekolamin sering bekerja bersama-sama dengan diaktifkannya HPA axis. Sebagai contoh, bersamaan dengan peningkatan hormon glukokortikoid dari korteks adrenal, aktivasi HPA axis juga akan meningkatkan produksi katekolamin dari medula adrenal.³³ Sel-sel di medula adrenal mensintesa dan mensekresikan nordrenalin dan adrenalin. Pada manusia, 80% katekolamin yang dikeluarkan dari medula adalah adrenalin.³⁴ Noradrenalin dilepaskan dari serabut-serabut saraf simpatis secara langsung di dekat jaringan target. Apabila diaktivasi secara akut,

sistem katekolaminergik akan memperkuat tubuh dalam menghadapi tantangan yang datang tiba-tiba. Secara tipikal dikatakan bahwa aktivasi sistem katekolaminergik akan memberi kestabilan mamalia primitive dalam bereaksi untuk lari atau menghadapi tantangan dengan meningkatkan denyut jantung dan meningkatkan aliran darah ke otot-otot skelet. Bila aktivasi SAM ini berlangsung kronis maka akan terjadi disregulasi sistem imun. Hubungan dari sistem saraf simpatik terhadap sistem imunitas didukung dari penelitian bahwa serabut-serabut saraf simpatis berjalan dari SSP menuju organ-organ limfoid baik primer maupun sekunder.³⁴

2.4. *Echinacea* sp sebagai imunostimulator

2.4.1. Latar belakang *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)^{39,40,65}.

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 lambat³⁹.

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 tenggorokan³⁹.

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 Serikat³⁹.

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^{39,40}.

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^{52,53}.

E.purpurea lebih mudah dibudidayakan secara komersial, sehingga merupakan spesies yang paling banyak digunakan di Amerika.

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.³⁸ 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.³⁹

Bahan-bahan kimia yang dikandung oleh *Echinacea 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 sesnsial (humulene, caryophylene),
phytosterol

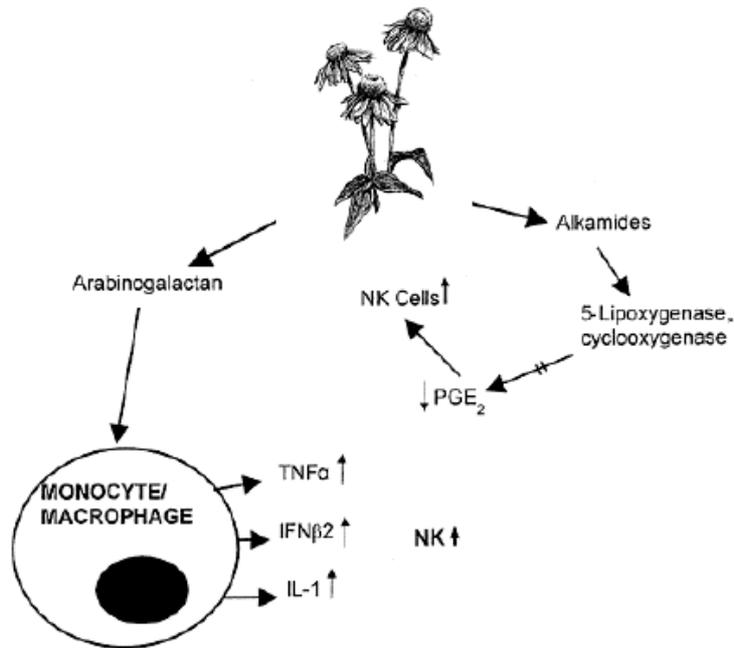
Beberapa spesies dari *Echinacea* mengandung beberapa bahan kimia lain. Sampai saat ini belum ada konsensus yang secara meyakinkan bahan mana yang merupakan bahan aktif immunomodulator^{49,50,53}.

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- α , IL-1, Interferon- β), 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^{51,54}.

Echinacin memiliki efek pada penyembuhan luka, terutama efek hambatan terhadap enzim hialuronidase dan stimulasi pertumbuhan dari fibroblast⁵¹.

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^{49,50}.



Gambar 6. Pengaruh Echinacea terhadap makrofag.⁶⁶

(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)

2.4.2. 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^{51,54,55,56,57,58}.

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- α , 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). Pada buku yang berjudul “The AIDS Fighters” menyebutkan bahwa *Echinacea* mungkin dapat membantu meningkatkan sistem kekebalan tubuh yang menurun pada penderita AIDS⁴⁶.

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 lipat⁴⁹.

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 hidup⁴⁹.

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 CRP⁴⁹.

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*^{51 54 55}

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 litik⁵³.

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^{51 54 55}

Pada penelitian *invivo* menggunakan tikus *sprague-dawley* didapatkan bahwa kandungan aktif *echinacea* yang meliputi *cichroid acid*, polisakarida dan alkylamid yang diberikan dalam dosis bertingkat sebanyak 2 kali sehari selama 4 hari akan meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag alveoler. Disamping itu juga didapatkan peningkatan TNF- α dan pelepasan Nitric Oxide (NO) makrofag alveoler yang dirangsang dengan Lipopolisakarida (LPS). Selain itu juga didapatkan peningkatan produksi TNF- α dan interferon- γ pada makrofag liennya.⁵⁰

2.4.3. Keamanan dan kemanjuran *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*⁴⁸.

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 jarang⁴⁹.

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 dilaporkan⁴⁹.

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^{48,49}.

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^{48,49}.

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^{48,60}.

Meskipun sekolah farmasi di Richmond, Virginia sudah menyatakan bahwa *echinacea* aman, namun para peneliti dalam edisi *Pharmacotherapy* pada bulan Juni 2000 menegaskan lagi bahwa *echinacea* aman untuk digunakan. Pasien-pasien tanpa kontraindikasi tidak perlu dicegah bila akan menggunakan sediaan *echinacea* untuk mengobati *common cold*.⁵¹

Penelitian *RCT double blinded* tahun 1999 juga mendukung kemanjuran dan keamanan *echinacea*. Para peneliti Jerman 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. Para peneliti menyimpulkan bahwa *echinacea* adalah mujarab dan aman digunakan. Mereka juga menggarisbawahi bahwa kegunaan terapetikanya adalah cepatnya onset penyembuhan gejala *common cold* dan perlunya menggunakan *echinacea* sesegera mungkin bila gejala-gejala *common cold* mulai dirasakan.⁵¹

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.^{48,60}

Efek stimulasinya berubah bila digunakan berkepanjangan, seharusnya jangan digunakan secara terus-menerus selama 8 minggu. Setelah penghentian obat, bisa di *restart* lagi untuk pengobatan 8 minggu berikutnya.⁵⁴

2.4.4. Dosis

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) = ½ - 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)

= ¼ sampai ½ sendok teh diberikan 3X sehari

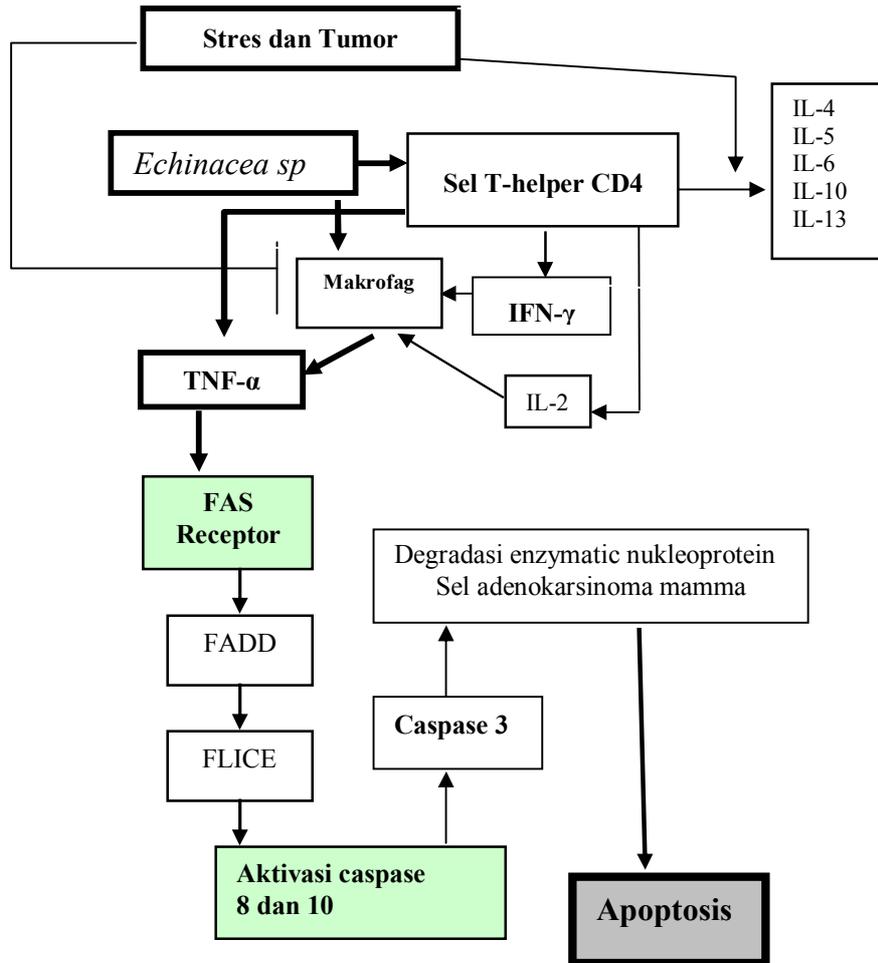
Freeze dried = 1 sampai 2 kapsul atau tablet diberikan 3X sehari

Injeksi = tidak tersedia di Amerika, namun sering digunakan di Jerman^{52,58}

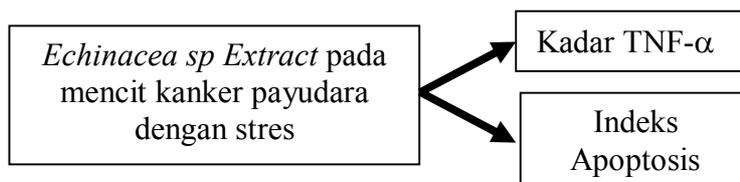
BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka teori



3.2. Kerangka konsep



3.3. Hipotesis

1. Kadar TNF- α makrofag mencit C3H kanker payudara yang diberi stres yang mendapat *echinacea sp* lebih tinggi bila dibandingkan dengan yang tidak mendapat *echinacea sp*
2. Indeks Apoptosis mencit C3H kanker payudara yang diberi stres dan mendapat *echinacea sp* lebih tinggi dibanding yang tidak mendapat *echinacea sp*
3. Ada korelasi antara produksi TNF- α dengan Indeks apoptosis jaringan tumor.

BAB 4

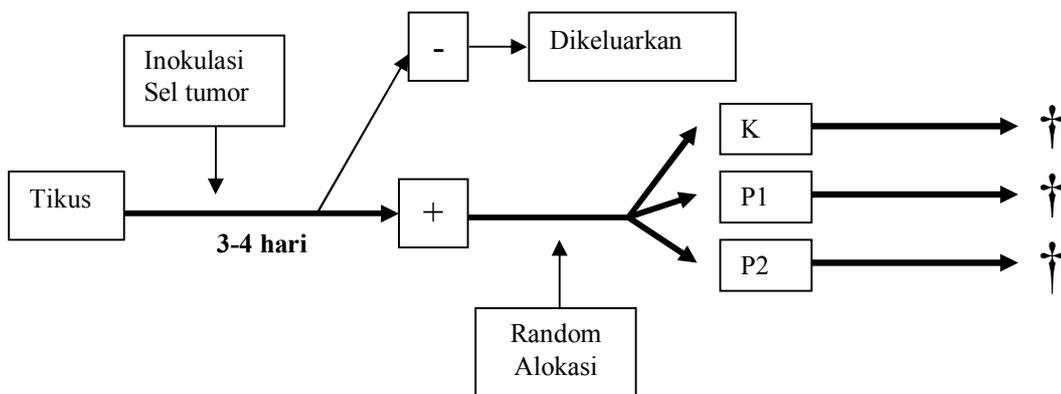
METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan pendekatan *The Post Test – Only Control Group Design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian.⁶² 18 mencit yang sudah diinokulasi tumor, dirandom alokasi ke dalam 3 yaitu kelompok kontrol (K), Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2) . Adapun pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

- K : Kelompok kontrol, mencit yang hanya di inokulasi sel kanker .
- P1 : Kelompok perlakuan 1, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan, mendapat stressor renjatan listrik
- P2 : Kelompok perlakuan 2, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan, mendapat stressor renjatan listrik dan ekstrak *Echinacea sp*

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

4.2. Populasi dan sampel

4.2.1. Populasi

Hewan coba adalah mencit betina strain C3H yang berusia 3 bulan dengan berat badan 20-30 gram setelah aklimatisasi dan tidak ada abnormalitas anatomis. Mencit ini diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Selama perlakuan, semua inokulasi tumor berhasil, dan tidak terdapat mencit yang sakit.

Besar sampel menurut WHO tiap kelompok minimal 5 ekor dengan cadangan 10%⁶⁰, pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok 6 ekor mencit.

Randomisasi: 18 mencit yang sudah berhasil diinokulasi dikelompokkan secara random menjadi 3 kelompok yaitu:

Kelompok K : 6 mencit

Kelompok P1 : 6 mencit

Kelompok P2 : 6 mencit.

4.2.2. Sampel

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

Kriteria Inklusi:

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

Kriteria Eksklusi:

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

Sebelum digunakan dalam penelitian, 18 ekor mencit diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu. Selama dalam pemeliharaan mencit diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Untuk menghindari bias terhadap berat badan maka dilakukan penimbangan mencit sebelum mendapat perlakuan.

4.2.3 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di:

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

4.3. Variabel penelitian

4.3.1. Variabel bebas:

Sebagai variabel bebas dalam penelitian ini adalah

1. Pemberian stressor berupa *electric foot shock*
2. Pemberian ekstrak *Echinacea sp*

4.3.2. Variabel tergantung:

- Nilai kadar TNF makrofag.

Skala variabel : Skala numerik.

- Indeks apoptosis sel kanker payudara yang dihitung sesuai metode yang digunakan oleh *Aihara M et al.* ⁶⁴

Skala variabel : Skala numerik.

4.4. Definisi Operasional:

1. *Electric foot shock* dilakukan dengan cara mengalirkan arus listrik pada lempeng tembaga di dasar kandang perlakuan tempat kaki mencit berpijak. Aliran listrik akan mengejutkan mencit. Besar arus listrik antara 1 – 3mA. Jumlah renjatan adalah 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 kejut, diberikan interval 4 menit untuk tiap sesi. Hari pertama diberikan 4 renjatan-2 sesi, hari kedua diberikan 8 renjatan-2 sesi bukannya 6 renjatan-2sesi, karena peningkatan sebanyak 2 renjatan x 2 sesi untuk hari kedua dianggap terlalu kecil.

Pemilihan stressor berupa renjatan listrik pada alas kaki dengan *electric foot shock* karena intensitas dapat terukur dengan tepat, penjalaran arus listrik dari kaki ke seluruh tubuh termasuk ke otak berjalan cepat dan pemulihan setelah renjatan tidak ada efek ikutan. Banyak penelitian telah dilakukan dengan renjatan listrik sebagai stressor untuk menimbulkan stress dan memberi dampak pada target spesifik, telah terbukti dan menunjukkan akurasi yang tepat. Sedangkan pemilihan lama waktu 10 hari adalah berdasarkan penelitian terdahulu bahwa kadar kortisol mulai meningkat pada hari ke-4, mencapai puncak pada hari ke-7 dan mulai menurun pada hari ke-14. Sehingga dapat diharapkan pengambilan unit sampel pada hari ke-11 sudah terjadi modulasi sistem imun.⁶²

2. Pemberian *echinaceae* melalui sonde dengan dosis 5,85mg /hari

3. Nilai kadar TNF makrofag

Diukur dari kultur makrofag cairan peritoneal [*Peritoneal Exudate Cells* (PEC)], diukur dengan cara *ELISA*, dalam satuan μ l

4. Indeks apoptosis sel kanker dihitung sesuai dengan metoda yang digunakan oleh *Aihara M et al*, di mana badan apoptotik dihitung per 100 sel tumor dengan pembesaran 400x, pada 10 lapangan pandang dari tiap preparat, dalam satu blok parafin. Kemudian diambil rata-rata hasilnya. Lapangan pandang dimulai dari kiri ke kanan, kemudian ke bawah dimulai dari kiri lagi. Bila ada daerah nekrosis atau epitel

kelenjar dihindari. Pengukuran dilakukan oleh 2 orang yaitu peneliti dan ahli Patologi Anatomi.

Skala variabel : rasio.

4.5. Bahan dan alat

- Mencit betina strain C3H dengan umur 3 bulan, dan berat 20 - 30 gram. Mencit diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia .
- Adenokarsinoma diperoleh dari mencit donor. Tumor yang mengandung sel adenokarsinoma dari mencit donor akan ditransplantasikan ke mencit resipien. Sebelum ditransplantasikan, tumor dari mencit donor akan diincisi biopsi dan dilakukan pemeriksaan histologi untuk mengkonfirmasi jenis tumornya
- Bahan transplantasi jaringan tumor pada mencit
 - Alkohol 70 %
 - Larutan Garam fisiologik
 - Es batu
 - Mencit donor bertumor
 - Mencit resipien
- Bahan-bahan untuk pemeriksaan imunologi:
 - *Peritoneal Exudate Cells* (PEC) dan hepar dari mencit betina strain C3H (hewan percobaan).
 - RPMI 1640.
 - *Foetal Bovine Serum* (FBS)
 - *Phosphate Buffer Saline* (PBS.)

- Tripan Blue.
- Antibiotika Penicillin-Streptomycin.
- Aquadest steril.
- Kit Mouse Mo Ab anti-TNF (ELISA) dng nilai sensitivitas 3 pg/ml.
- Bahan untuk pemeriksaan histopatologi rutin
 - Formalin buffer 10%.
 - Alkohol 50%, 70%, 80%, 96%, absolute.
 - Xylo.
 - Parafin cair (Histoplast).
 - Albumin dan Poly-L-Lysine.
 - Bahan pengecatan Hematoksin-Eosin (HE).
 - Canada balsam dan Entelan

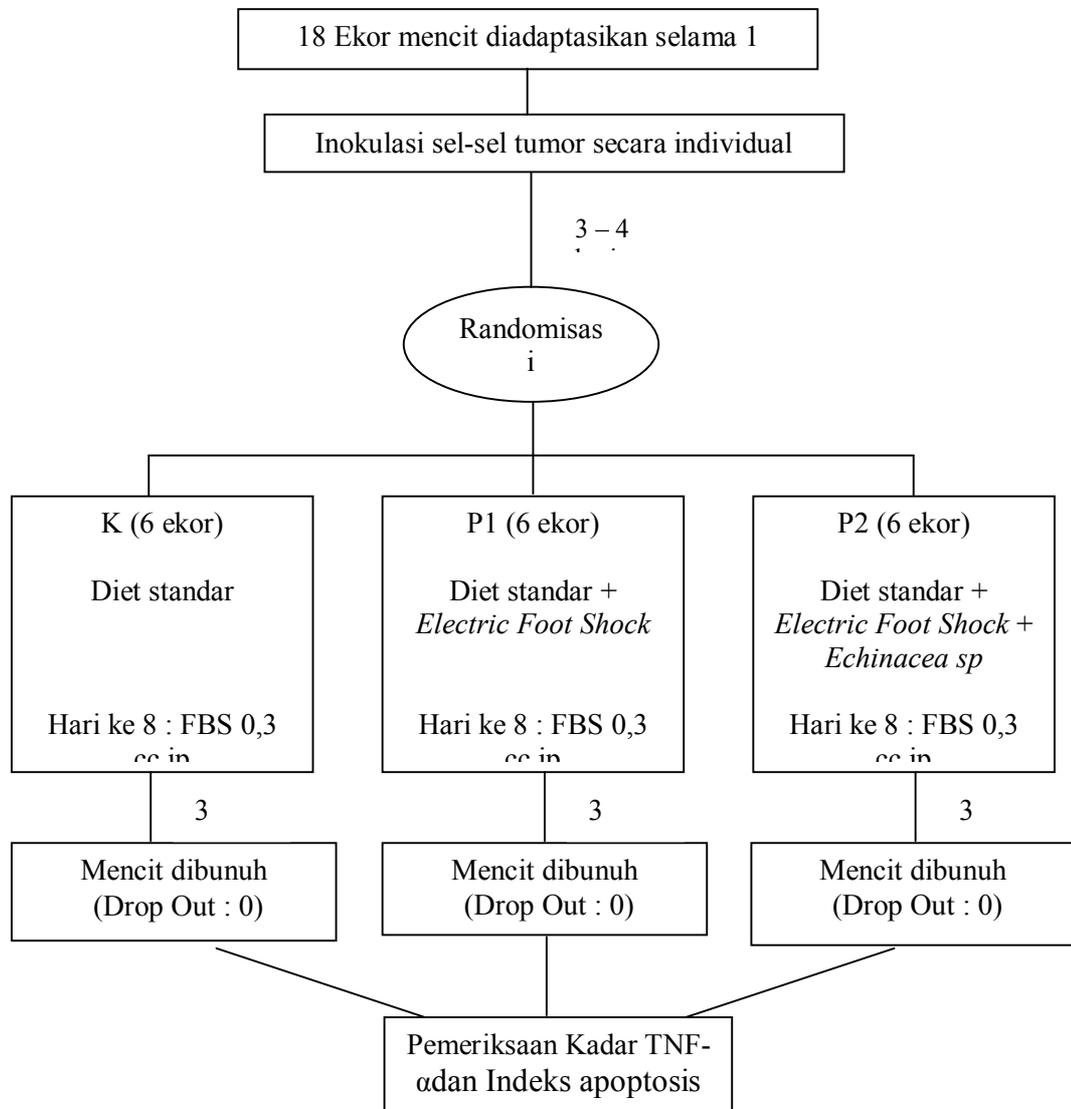
Alat/ instrumen penelitian.

- | | |
|---|-----------------------------------|
| • Mikroskop | • Inkubator buatan Schwabach |
| • Sput 1cc, 10 cc | • Termometer |
| • Tabung Sentrifus 15 cc, 50 cc | • Tabung reaksi dengan alas datar |
| • Lampu Bunsen | • Microplate 96 wells |
| • Cawan Petri | • Pinset, scalpel |
| • Gunting bengkok dan lurus | • <i>Yellow & Blue tape</i> |
| • Kanul mulut | • Autoclav |
| • Pipet Pasteur & Pipet Eppendorf | • <i>Laminar Flow</i> |
| • ELISA reader | • Timbangan elektronik dan biasa |
| • 24 buah kandang hewan coba individual | |
| • Alat sentrifugasi yang dilengkapi pengatur suhu | |

4.6. Prosedur pengumpulan data

- ◆ 18 ekor mencit betina strain C3H dengan umur 3 bulan, dan berat 20 - 30 gram diaklimatisasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi pakan standar selama satu minggu secara *ad libitum*.
- ◆ Dilakukan inokulasi sel-sel kanker pada masing-masing mencit kemudian ditunggu selama 3-4 hari.
- ◆ 18 ekor mencit yang telah terpapar kanker tersebut kemudian dibagi menjadi 3 kelompok masing-masing 6 ekor yang ditentukan secara acak dengan komputer, masing-masing kelompok dikandangkan secara individual.
- ◆ Masing-masing kelompok mendapatkan pakan standar yang sama.
- ◆ Kelompok pertama hanya mendapatkan makanan standar, pada hari ke-8 dilakukan injeksi *Foetal Bovine Serum (FBS)* 0,3cc secara i.p. 3 hari kemudian mencit dibunuh untuk diperiksa TNF- α nya.
- ◆ Kelompok kedua selain mendapatkan makanan standar juga mendapatkan stressor renjatan listrik menggunakan *electric foot shock*, pada hari ke-8 dilakukan injeksi *Foetal Bovine Serum (FBS)* 0,3cc secara i.p. 3 hari kemudian mencit dibunuh untuk diperiksa TNF- α nya.
- ◆ Kelompok ketiga selain mendapatkan stressor renjatan listrik menggunakan *electric foot shock* juga mendapatkan ekstrak *Echinacea sp*, pada hari dilakukan injeksi *Foetal Bovine Serum (FBS)* 0,3cc secara i.p. 3 hari kemudian mencit dibunuh untuk diperiksa TNF- α nya.

4.7. Alur kerja



4.8. Prosedur-prosedur laboratorium

4.8.1. Prosedur transplantasi tumor

1. Mencit donor dimatikan dengan eter, kemudian diletakkan terlentang pada tatakan / alas fiksasi dan keempat kakinya difiksasi dengan jarum.
2. Kulit dibagian yang bertumor diusap dengan alkohol 70 %, kemudian dibuat sayatan dengan gunting lurus, untuk mengeluarkan tumor.

3. Tumor diletakkan di cawan petri kecil yang telah terlebih dahulu dicuci dengan garam fisiologis dan diletakkan diatas es.
4. Amati bentuk dan keadaan tumor, kemudian ambil/potong jaringan tumor yang masih baik yaitu bagian yang tanpa nekrosis (biasanya di daerah tepi jika tumor besar) sebanyak kira-kira yang dapat menghasilkan bubur tumor paling sedikit 1 ml dan taruh dicawan petri kecil lainnya. Bersihkan dari jaringan ikat (simpai), jaringan nekrotik dan darah, kemudian cacah/potong-potong sampai halus dengan gunting hingga akhirnya terbentuk “bubur tumor” yang partikelnya dapat melewati jarum trokar. Tambahkan garam fisiologis lebih kurang sama banyak dengan volume tumor.
5. Bubur tumor disuntikkan subkutan aksila kanan mencit dengan dosis 0,2 ml.
6. Sisa tumor yang padat dimasukkan ke dalam botol formalin untuk dibuat sediaan mikroskopik.
7. Masing-masing mencit diberi nomor ditelinganya dan dimasukkan ke dalam kandang berbeda yang diberi label berisi : jenis kelompok perlakuan, tanggal transplantasi.

4.8.2. Prosedur pembuatan kultur Makrofag dari cairan peritoneal

1. Mencit dibunuh dengan dislokasi leher setelah dinarkose menggunakan chloroform. Mencit diletakan dalam posisi terlentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneumnya dengan alkohol 70%.

2. Suntikkan 10 ml medium RPMI dingin yang mengandung 2% FBS ke dalam rongga peritoneum, tunggu 2 menit sambil ditekan-tekan secara perlahan.
3. Cairan peritoneal diaspirasi dari rongga peritoneum dengan cara menekan organ dalam dengan 2 jari, cairan diaspirasi dengan spuit injeksi, dipilih bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus. Aspirat yang didapat ditampung dalam tabung sentrifus.
 - a. Aspirat yang didapat kemudian disentrifus pada 400g, 4°C selama 10'.
 - b. Supernatan dibuang, cuci 2X dengan RPMI yang mengandung 2% FBS.
 - c. Kemudian ditambahkan 2 ml medium RPMI komplet (RPMI 1640 yang mengandung *L-glutamin* (1mM), *Foetal Bovine Serum* (FBS)5% dan ditambah antibiotika Penicillin 50 unit dan streptomycin 50 µg per ml),dan disentrifusasi pada 400g, 4°C selama 10'.
 - d. Buang supernatan dan bila perlu larutkan dengan 3% asam asetat dalam PBS untuk melisiskan sel darah merah kemudian disentrifus pada 400g, 4°C selama 10'.
 - e. Cuci dengan RPMI yang mengandung 2% FBS.
 - f. Resuspensikan dengan medium komplet.
 - g. Jumlah sel yang didapat dihitung menggunakan bilik hitung Neubauer setelah diwarnai dengan Tripian Blue sehingga didapatkan suspensi sel dengan kepadatan 10^6 / ml.
 - h. Sel yang didapatkan ini digunakan untuk pemeriksaan TNF- α .

4.8.3. Prosedur pemeriksaan TNF- α makrofag

1. Siapkan microplate 96 sumuran yang telah dilapisi antibodi monoklonal terhadap TNF- α mencit.
2. Cuci microplate dengan memasukkan buffer pencuci sebanyak 300 μ l setiap sumuran. Caranya dengan melakukan aspirasi berulang menggunakan pipet tanpa menggores permukaannya. Lakukan pengeringan dengan membalikkan mikroplate diatas kertas tissue selama \pm 15 menit.
3. Buat larutan standar dengan memasukkan 100 μ l pelarutan sampel dalam sumuran. Tambahkan 100 μ l larutan standar TNF- α dalam sumuran. Lakukan pengenceran bertahap sebanyak 5 kali dengan memasukkan 100 μ l campuran larutan yang diambil dari sumuran pertama ke sumuran kedua dan seterusnya. Pada sumuran yang terakhir larutan dibuang. Semua dilakukan secara duplo.
4. Buat larutan blangko dengan hanya memasukkan 100 μ l pelarutan sampel secara duplo.
5. Siapkan kultur yang akan diperiksa dengan memasukkan 50 μ l larutan sampel dalam semua sumuran yang telah diisi 50 μ l kultur.
6. Tambahkan 50 μ l larutan *biotin konjugat* ke semua sumuran termasuk sumuran blangko.
7. Tutup dengan *plate cover* dan diinkubasikan dalam suhu ruangan (18⁰C – 25⁰C) selama 2 jam diatas *microplate shaker* dengan kecepatan 200 rpm.
8. Buka *plate cover* , kosongkan sumuran dan dicuci 3X.

9. Tambahkan 50 μ l larutan *Streptavidin-HRP* ke semua sumuran termasuk sumuran blangko.
10. Tutup dengan *plate cover* dan diinkubasikan dalam suhu ruangan (18°C – 25°C) selama 1 jam diatas *microplate shaker* dengan kecepatan 200 rpm.
11. Buka *plate cover* , kosongkan sumuran dan dicuci 3X.
12. Tambahkan 100 μ l campuran larutan *substrat TMB* ke semua sumuran termasuk sumuran blangko.
13. Tutup dengan *plate cover* dan diinkubasikan dalam suhu ruangan (18°C – 25°C) selama 10 menit diatas *microplate shaker* dengan kecepatan 200 rpm. Hindari sinar matahari langsung. Amati terjadinya perubahan warna.
14. Stop reaksi enzim dengan menambahkan 100 μ l *stop solution* dalam tiap sumuran.
15. Baca absorbansinya pada gelombang 450 nm menggunakan *Elisa Microplate Reader Biotrak II*.

4.8.4. Prosedur pembuatan preparat Patologi Anatomi

a. Fiksasi

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

b. Dehidrasi

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

c. Impregnasi

Jaringan dimasukkan dalam paraffin cair selama 2x2 jam.

d. Embedding .

Jaringan ditanam dalam paraffin padat yang mempunyai titik lebur 56-58⁰C, ditunggu sampai paraffin padat. Jaringan dalam paraffin dipotong setebal 4 mikron dengan mikrotom. Potongan jaringan ditempelkan pada kaca obyek yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Jaringan pada kaca obyek dipanaskan dalam incubator suhu 56-58⁰C sampai paraffin mencair.

e. Pewarnaan jaringan dengan H&E

Secara berurutan jaringan pada kaca obyek dimasukkan dalam:

| | | | |
|-----------------|---------|------------------|----------|
| 1. Xylol | 1 menit | 11. Air | 15 detik |
| 2. Xylol | 2 menit | 12. Alkohol 80% | 15 detik |
| 3. Xylol | 2 menit | 13. Alkohol 96% | 30 detik |
| 4. Alkohol 100% | 2 menit | 14. Alkohol 100% | 45 detik |
| 5. Alkohol 96% | 2 menit | 15. Xylol | 1 menit |
| 6. Alkohol 70% | 1 menit | 16. Xylol | 1 menit |
| 7. Air | 1 menit | | |

8. Mayer HE 7,5 menit
9. Air 7,5 menit
10. Eosin (0,5%)–alcohol–asan asetat 1 menit

4.9. Analisa data

Setelah data terkumpul, data hasil penelitian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan boxplot. Untuk mengetahui normalitas data dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk test*. Karena data berdistribusi normal maka dilakukan uji *One Way Anova* untuk melihat adanya perbedaan pada ketiga kelompok perlakuan. Besarnya perbedaan masing-masing kelompok perlakuan dianalisis lebih lanjut dengan *Post Hoc Test Bonferoni*. Untuk melihat adanya korelasi masing-masing variabel yang diukur, dianalisis dengan menggunakan uji korelasi *Pearson's product moment* (distribusi normal).^{66,67} Semua analisis statistik tersebut dilakukan dengan menggunakan program komputer SPSS 10.05 for windows. Nilai signifikansi pada penelitian ini adalah apabila variabel yang dianalisis memiliki nilai $p < 0,05$.^{63,64}

4.10. Persyaratan etik

Implikasi etik pada hewan, pengelolaan binatang coba pada penelitian ini mengikuti *animal ethics*. Hal yang perlu dilaksanakan sesuai dengan etik antara lain perawatan dalam kandang, pemberian makan minum (*ad libitum*), aliran udara dalam ruang kandang, perlakuan saat penelitian, menghilangkan rasa sakit, pengambilan unit analisis penelitian, dan pemusnahannya. Dan sebelum penelitian dilaksanakan, proposal akan dimintakan persetujuan Komis Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran UNDIP. Seluruh hewan coba akan dirawat sesuai standar pemeliharaan binatang.

BAB 5

HASIL

5.1. Kadar TNF- α

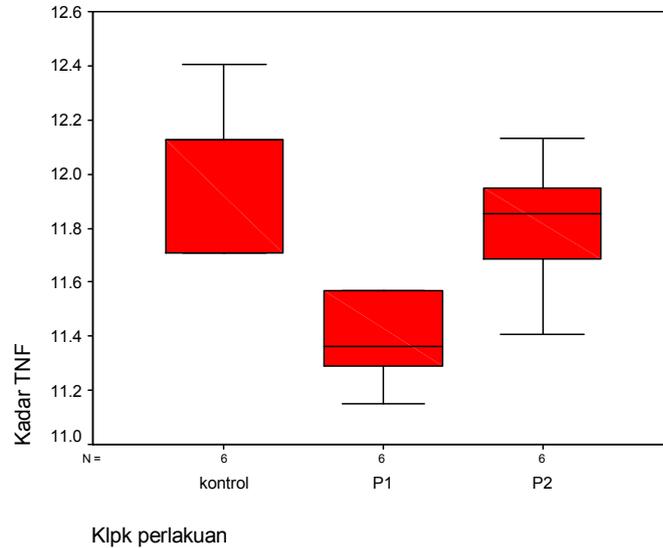
Kadar TNF- α diukur dengan membaca absorbansinya pada gelombang 450 nm menggunakan *Elisa Microplate Reader* ELX 800. Hasil pengukuran kadar TNF - α dapat dilihat pada tabel-2.

Tabel-2. Nilai rata-rata hasil pengukuran produksi TNF - α pada tiap kelompok percobaan

| Produksi TNF α | Kontrol pg/ml | Perlakuan 1 pg/ml | Perlakuan 2 pg/ml |
|---|--------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Rerata (SD); | 12,034; (0,27); | 11,384; (0,18); | 11,812; (0,25); |
| Median | 12,126 | 11,361 | 11,854 |

Uji *Bonferoni* pada variabel kadar TNF- α menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,001$) antara kelompok kontrol (K) (12,034 \pm 0,27) pn/ml dan perlakuan 1 (P1) (11,384 \pm 0,18) pn/ml, dan terdapat perbedaan yang bermakna juga ($p=0,020$) antara kelompok perlakuan 1 (P1) (11,384 \pm 0,18) pn/ml dan perlakuan 2 (P2) (11,812 \pm 0,25) pn/ml . Sedangkan antara kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan 2 (P2) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,375$).

Boxplot kadar TNF- α dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar-7. Boxplot kadar TNF- α

5.2. Indeks Apoptosis

Indeks apoptosis dihitung dengan metode *Aihara et al.* Hasil pengukuran nilai rata-rata indeks apoptosis dapat dilihat pada tabel-3.

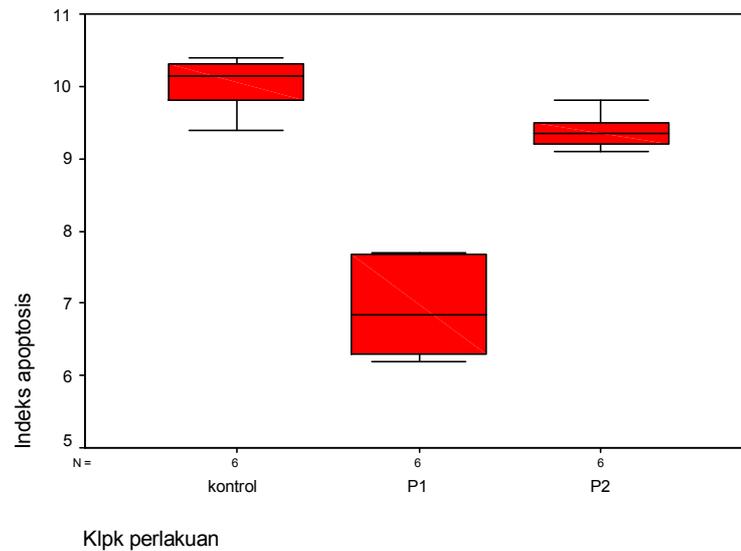
Tabel-3. Nilai rata-rata hasil penghitungan indeks apoptosis pada tiap kelompok percobaan

| Indeks apoptosis | Kontrol % | Perlakuan 1 % | Perlakuan 2 % |
|------------------|-----------------|------------------|--------------------|
| Rerata (SD); | 10,033; (0,37); | 6,923; (0,65); | 9,38; (0,25); 9,35 |
| Median | 10,150 | 6,83 | |

Uji *Bonferoni* pada variabel indeks apoptosis menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,001$) antara kelompok kontrol (K) ($10,033 \pm 0,37$) % dan perlakuan 1 (P1) ($6,92 \pm 0,65$) %, dan terjadi perbedaan bermakna ($p < 0,001$) juga antara kelompok perlakuan 1 (P1) ($6,92$

$\pm 0,65$) % dan perlakuan 2 (P2) ($9,38 \pm 0,25$) %. Sedangkan antara kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan 2 (P2) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,077$).

Boxplot Indeks apoptosis dapat dilihat pada gambar 10 berikut :



Gambar-8. *Boxplot* Indeks apoptosis

5.3. Uji Statistik

Penelitian ini dilakukan pada 18 sampel, dilakukan analisa statistik dengan uji *One way ANOVA* . Pada eksplorasi data, untuk uji normalitas data digunakan uji *Shapiro Wilk*, didapatkan hasil data berdistribusi normal ($p > 0,005$).

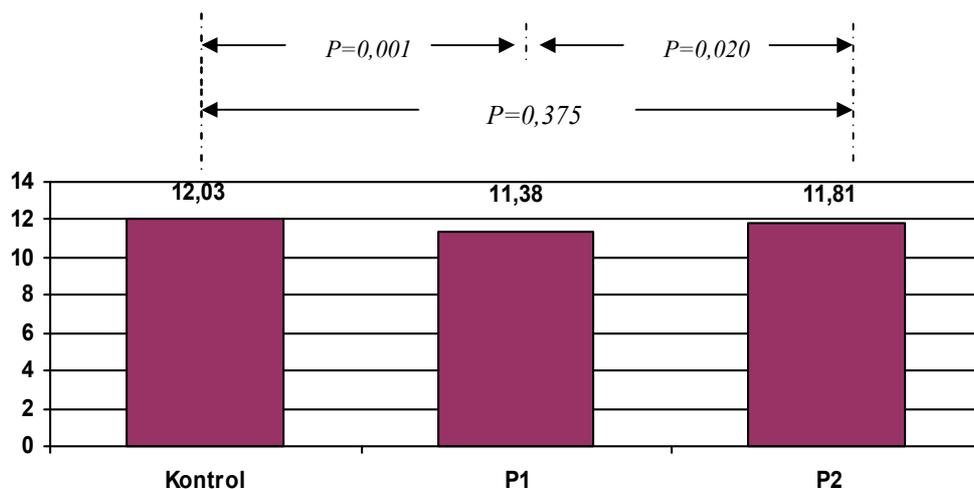
Pada penelitian ini uji homogenitas varian dapat dilihat dari output *Levene's test* . Nilai p pada *Levene's test* didapatkan hasil lebih besar dari

0,05. Ini menunjukkan nilai varian data TNF- α dan indeks apoptosis pada ketiga kelompok perlakuan tersebut adalah homogen.

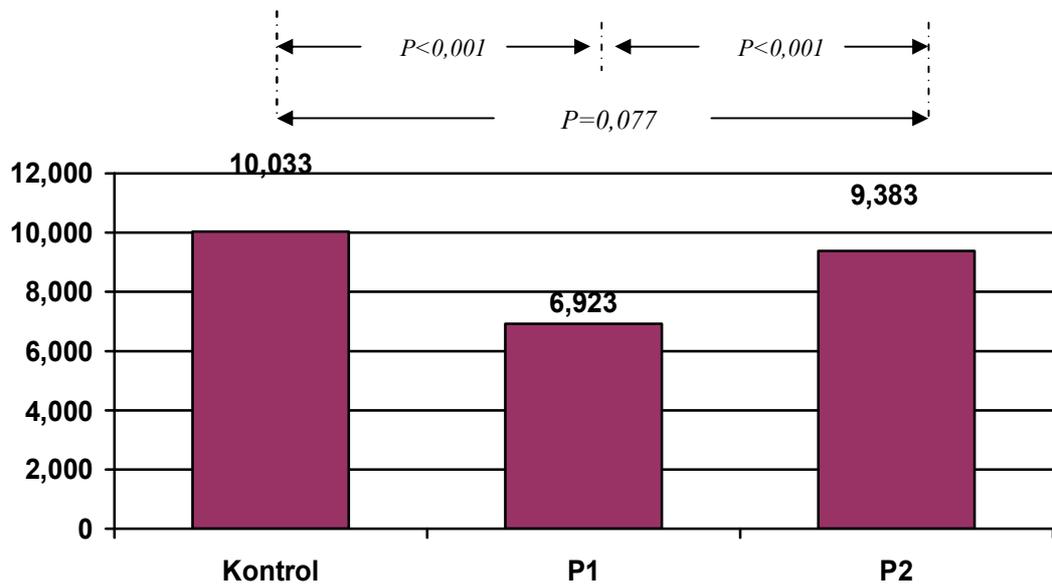
Analisis uji beda, dilakukan terhadap variabel kadar TNF- α dan indeks apoptosis. Oleh karena skala variabel independen maupun dependennya numerik dan distribusi datanya normal, maka analisis statistik untuk uji beda semua kelompoknya menggunakan *One way ANOVA*. Uji beda untuk masing-masing kelompok menggunakan *Bonferoni test*.

Dari tabel uji homogenitas diketahui bahwa data pada variabel kadar TNF- α ($p=0,543$) dan indeks apoptosis ($p=0,085$) adalah homogen. Sehingga *post hoc test* untuk variabel-variabel tersebut adalah dengan menggunakan uji *Bonferoni*.

Hasil uji *ANOVA* didapatkan bahwa keseluruhan kelompok dari variabel kadar TNF- α mempunyai perbedaan yang bermakna ($p=0,001$). Variabel indeks apoptosis pada uji tersebut juga menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna secara statistik ($p<0,001$).



Gambar-9. Hasil *Post Hoc test* kadar TNF- α dengan uji *Bonferroni*.



Gambar-10. Hasil *Post Hoc test* indeks apoptosis dengan uji *Bonferroni* .

Dari uji korelasi Pearson di dapatkan bahwa indeks apoptosis mempunyai korelasi positif yang bermakna ($p = 0,001$) terhadap kenaikan ekspresi TNF- α , dengan koefisien korelasi positif sebesar 0,695. Bila TNF- α nya meningkat, maka indeks apoptosis juga meningkat.

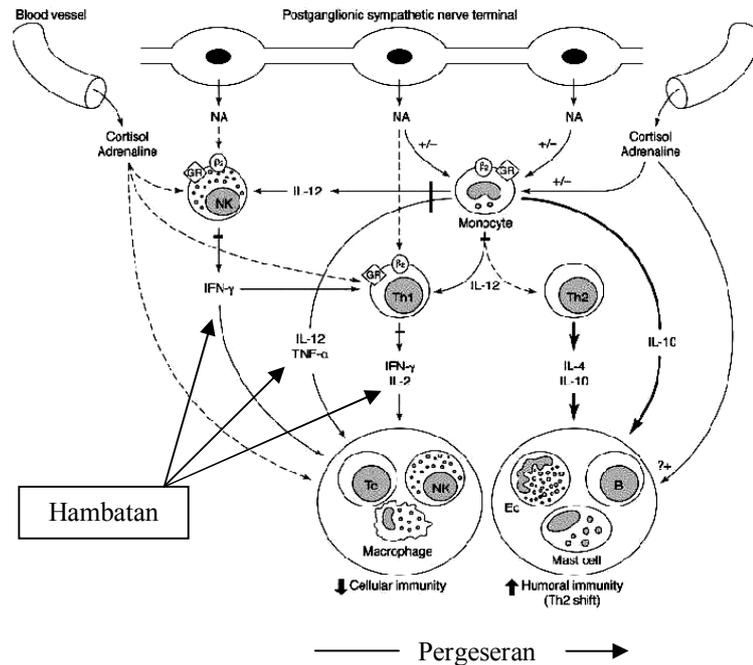
Tabel-4 Uji korelasi kadar TNF- α dan Indeks Apoptosis .

| | | Indeks apoptosis | Kadar TNF |
|------------------|---------------------|------------------|-----------|
| Indeks apoptosis | Pearson Correlation | 1,000 | ,695 |
| | Sig. (2-tailed) | , | ,001 |
| | N | 18 | 18 |
| Kadar TNF | Pearson Correlation | ,695 | 1,000 |
| | Sig. (2-tailed) | ,001 | , |
| | N | 18 | 18 |

BAB 6

PEMBAHASAN

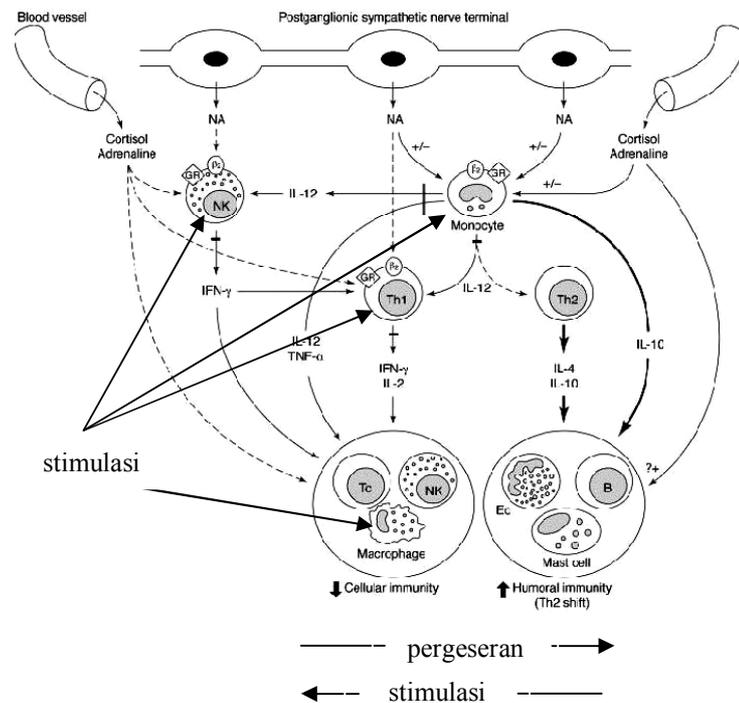
Dari 18 ekor tikus dalam penelitian, ternyata tidak ada satu pun dari ketiga kelompok perlakuan yang mengalami *drop out*. Pada kelompok mencit dengan kanker payudara yang mengalami stress (P1), terdapat penurunan kadar *TNF- α* . Penurunan kadar *TNF- α* pada kelompok P1 ini disebabkan karena stres 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*. Efek sistemik dari *glukokortikoid* dan *katekolamin* ini mempengaruhi pengaturan *sitokin*. Stres akan menurunkan produksi *sitokin* yang dibutuhkan dalam respon imunitas seluler⁷. Pada saat disekresikan *kortisol* dan *adrenalin* akan terjadi hambatan *ekspresi IL-2, IFN- γ* , di mana *IFN- γ* sangat penting untuk stimulasi sel-sel efektor sistem imun seluler seperti *Makrofag*. Pada saat mendapatkan stres, makrofag mengalami *anergi*, sehingga kemampuan baik sebagai sel *effektor* maupun *APC* menurun. Bila *makrofag* mengalami *anergi*, maka ekspresi *TNF- α* nya menurun. Hal ini dapat dilihat pada gambar di bawah ini



Mekanisme yang terjadi pada stress dan sistem imun

Pada kelompok perlakuan 2 (P2) di mana pada kelompok ini mendapatkan imunostimulator, terlihat bahwa kadar $TNF-\alpha$ juga menurun tetapi tidak signifikan dibandingkan kelompok kontrol. Dibandingkan dengan kelompok P1 yang mendapatkan stres tetapi tidak mendapat imunostimulator, maka pada kelompok P2 yang mendapat imunostimulator, penurunan kadar $TNF-\alpha$ berbeda bermakna. Penurunan kadar $TNF-\alpha$ pada kelompok P2 dibandingkan dengan kelompok kontrol adalah tidak bermakna, Efek imunostimulator *Echinacea* yang diberikan akan mengaktifasi makrofag dan meningkatkan $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$, dan $IL-12$ yang penting untuk aktifitas imunitas seluler. hal ini membuktikan bahwa pemberian imunostimulator pada mencit kanker payudara dengan stres akan memperbaiki kemampuan makrofag untuk menghasilkan $TNF-\alpha$. Hal ini terjadi

karena imunostimulator *Echinacea sp* yang diberikan akan mengaktifasi makrofag sehingga makrofag yang ada, baik sebagai APC maupun sebagai efektor akan aktif dan menghasilkan sitokin-sitokin yang penting untuk aktifitas imunitas seluler⁴⁰.



Mekanisme yang terjadi pada stress dan sistem imun

Pada kelompok perlakuan 1 (P1), dimana diberikan stres (renjatan listrik) pada mencit C3H dengan kanker payudara, didapat bahwa indeks apoptosis menurun secara bermakna bila dibandingkan dengan kontrol. Penurunan indeks apoptosis pada kelompok P1 disebabkan karena stres yang diberikan pada kelompok ini. Penurunan indeks apoptosis diakibatkan oleh penurunan kadar *TNF*, di mana *TNF* dapat menginduksi apoptosis sel tumor melalui reseptor *FAS*. Pada kelompok perlakuan 2 (P2) di mana pada kelompok ini selain diberi stres juga mendapatkan imunostimulator (*Echinacea sp*), terlihat juga penurunan indeks

apoptosis namun tidak bermakna bila dibandingkan kelompok kontrol. Dibandingkan dengan kelompok P1 yang mendapatkan stres tetapi tidak mendapat imunostimulator, maka pada kelompok P2 yang mendapat imunostimulator, penurunan indeks apoptosis tersebut berbeda bermakna. Penurunan indeks apoptosis pada kelompok P2 dibandingkan dengan kelompok kontrol adalah tidak bermakna, hal ini membuktikan bahwa pemberian imunostimulator berupa *Echinacea sp* pada mencit kanker payudara dengan stres akan memperbaiki indeks apoptosis.

Kadar ekspresi TNF mempunyai korelasi positif dengan *indeks apoptosis*. *Apoptosis* yang terjadi pada sel tumor disebabkan oleh aktivasi *caspase intraseluler*. Pengaktifan *caspase* dapat melalui reseptor *CD95/Fas* terjadi bila kontak dengan *Fas ligand*. *Fas ligand* ini bisa berasal dari ekspresi protein antigen dari *CTL*, atau pun *TNF*.

Korelasi antara ekspresi *TNF- α* dengan indeks apoptosis adalah positif dengan koefisien korelasi sebesar 0,695, hal ini disebabkan inisiasi apoptosis dapat melalui berbagai *pathway*. Efek imunostimulator *Echinacea* yang diberikan akan mengaktifasi *makrofag* dan meningkatkan *TNF- α* , *IFN- γ* , dan *IL-12* yang penting untuk aktifitas *imunitas seluler*.⁴⁰

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 sebaran *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 lipat⁶⁵.

Penelitian lain secara laboratoris atau in vitro, Echinacea akan mengaktivasi dan meningkatkan jumlah sel NK melalui peningkatan produksi *TNF- α* , *Interleukin-1*, *Interleukin-6*. Aktivitas *fagositosis*, *proliferasi seluler* dan kapasitas dari *killing* sel tumor juga terjadi peningkatan.^{42,44}

Pada penelitian invivo menggunakan tikus sprague-dawley didapatkan bahwa kandungan aktif *echinacea* yang meliputi *cichroid acid*, polisakarida dan alkylamid yang diberikan dalam dosis bertingkat sebanyak 2 kali sehari selama 4 hari akan meningkatkan kemampuan *fagositosis makrofag alveoler*. Disamping itu juga didapatkan peningkatan *TNF- α* dan pelepasan Nitric Oxide (NO) makrofag alveoler yang dirangsang dengan *Lipopolisakarida* (LPS). Selain itu juga didapatkan peningkatan produksi *TNF- α* dan *Interferon- γ* pada makrofag liennya.⁵⁰

BAB 7

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

1. kadar *TNF- α* mencit C3H dengan *adenocarcinoma* yang mendapat stres antara yang mendapat *Echinacea sp* lebih tinggi daripada yang tidak mendapat *Echinacea sp* yaitu $11,812 \pm 0,25$ pn/ml : $11,384 \pm 0,18$ pn/ml.
2. Indeks Apoptosis sel tumor mencit C3H dengan *adenocarcinoma* yang mendapat stres antara yang mendapat *Echinacea sp* lebih tinggi daripada tidak mendapat *Echinacea sp*. yaitu $9,38 \pm 0,25$ % : $6,923 \pm 0,65$ %.
3. Ada korelasi positif kuat antara ekspresi *TNF- α* dengan indeks apoptosis dengan koefisien korelasi sebesar 0,695.

Saran

Echinacea sp mempunyai efek terhadap peningkatan kadar *TNF- α* dan indeks apoptosis pada mencit C3H dengan *adenokarsinoma* dan stres, maka perlu dipikirkan pengembangan untuk kelanjutan uji klinik terhadap manusia.

Untuk mengetahui pengaruh *echinacea sp* terhadap respon imun pada sel kanker masih diperlukan penelitian lanjutan lagi, misalnya perkembangan massa tumor, sehingga bisa diaplikasikan secara klinis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kols Adrienne. Breast Cancer : Increasing Incidence, Limited Option. The OutLook June 2002; Vol 19, Number 4 (revised).
2. Imaginis – Breast Cancer : Statistics on Incidence, Survival, and Screening. Imaginis corp 2004.
3. Shirley IM, MD. Epidemiologi kanker payudara dan pengendaliannya. Medika 2000;5:326-9.
4. Sugito H. Kanker di Indonesia Tahun 1994 Data Histopatologik. Badan Registrasi Kanker Ikatan Ahli Patologi Indonesia. Dirjen YanMed Dep. Kes RI ; 1994 : 3-6.
5. Sarjadi, Trihartini. Cancer registration in Indonesia. Asian Pasific J Cancer Prev, IACR Supplement, 2001; 2: 21-24.
6. Nambiar. Breast cancer in Singapore. The 10th Asia Pasific cancer conference. 1st ed. IAP. Beijing.1991.
7. Elemkov IJ and Chrousos GP. Stress hormones, Th1/th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and susceptibility to disease. TEM 1999;10(9):359-68.
8. Burger R, Torres A, Warren R, Caldwell V, Hughes B. Echinacea-induced cytokine production by human macrophages. Int J Immunopharmacol. 1997; 19(7): 371-9.
9. Mishima S, Saito K, Maruyama H, Inoue M, Yamashita T, Ishida T, Gu Y. Antioxidant and immuno-enhancing effects of Echinacea purpurea. Biol Pharm Bull. 2004 jul;27(7):1004-9.
10. Virginia KL, Colin AP, Raman Q, Edwin DS. Breast cancer. In: Philip R, Sandra M, Raman Q, editors. Clinical oncology. 7th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1993: 187-94
11. Tomita M, Irwin KI, Xie ZJ, Santoro TJ. Tea Pigments Inhibit the Production of type 1 (T(H1)) and Type 2 (T(H2)) helper T cell cytokines in CD4(+) T Cells. Medical College of Ohio ,Glendale avenue.Toledo;2002 ; 16(1) : 36–42.
12. Wunderlich J R., Restifo N P.. Essentials Of Immunology . Cancer: Principles & Practice of Oncology, Fifth Edition Vincent T. DeVita, Jr. M.D., Samuel Hellman, M.D., Steven A. Rosenberg, M.D. Ph.D. Philadelphia 1997, 3 : 47-75
13. Contran RS, Kumar V, Robbins SL. Robin Pathologic basis of Disease. 5th ed. Philadelpia : WB Saunders, 1994

14. Dickson R B., Lippman M E. Cancer Of The Breast. Cancer: Principles & Practice of Oncology, Vincent T. DeVita, Jr. M.D., Samuel Hellman, M.D., Steven A. Rosenberg, M.D. Ph.D. Eds; 5th Ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1997, 36 : 1541-1616
15. Stites DP, Terr Abba I, Parslow TP, .Medical Immunology, 9th ed, Stamford Connecticut, USA: Appleton & Lange, 1997
16. Abbas A, Lichtman Ah, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 3rd ed. Philadelphia : WB Saunders, 1997 : 90-2,161,165-8,220-1,258-9,266-7,269,279-80,290-5,383-405.
17. Kumpulan Naskah Ilmiah. Perhimpunan Ahli Bedah Onkologi Indonesia (PERABOI). Muktamar Nasional VI : 2003.
18. Sobin LH, Wittekind CH ed. Classification of Malignant Tumours TNM. International Union Against Cancer UICC ; 6th ed. A John Wiley & Sons Inc.2002 : 131-41.
19. Junqueira LC, Arneiro j, Kelley RO. Basic Histology. 8th ed. Prentice Hall International inc London.1995 : 423-46.
20. Hayes Malcolm, MD. Reporting Pathology Specimen for Breast Cancer. British Columbia Cancer Agency; Vancouver Canada. Available from : URL : <http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonlyres/enyptzz527vtdpy2qov5ngwe5wdre7vp r6nss5lmr2ohyqmpbyg32zgi25y4kqcyysnukvreieo7pk/PathologychecklistBREA STREPORTING4.doc>
21. Cardiff Robert G, MD., Jensen Roy A, MD. Histological Grading of Breast Cancer. Available from : URL : http://ccm.ucdavis.edu/bcancercd/311/grading_diagram.html
22. Roitt IM, 1988. Essentiale Immunology, 6th ed. Blackwell sci. publ. London
23. Goodman JW. The Immune Response, in Basic and Clinical Immunologi. 8th ed. Stites DP, Terr A I eds.,Prentice-Hall Int.Inc.,USA..
24. Ladish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky S.Lawrence, Matsudaira P, Darnell J. Molecular Cell Biology. 3rd ed. New York: Scientific American Books; 1996. p. 886–98,1247–70.
25. Constatinides P. General Pathobiologi. Connecticut: Appleton & Lange,1994 : 173 – 90.
26. Sarjadi. Karsinoma epidermoid serviks uteri (Beberapa aspek epidemiologi serta peran histopatologi dan petanda tumor dalam penentuan prognosis). Disertasi doktor Universitas Diponegoro. Semarang, 1985

27. Soini Y, Paakko P, Lehto V. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. *Am J Pathol* 1998;153:1041-53. Available from:

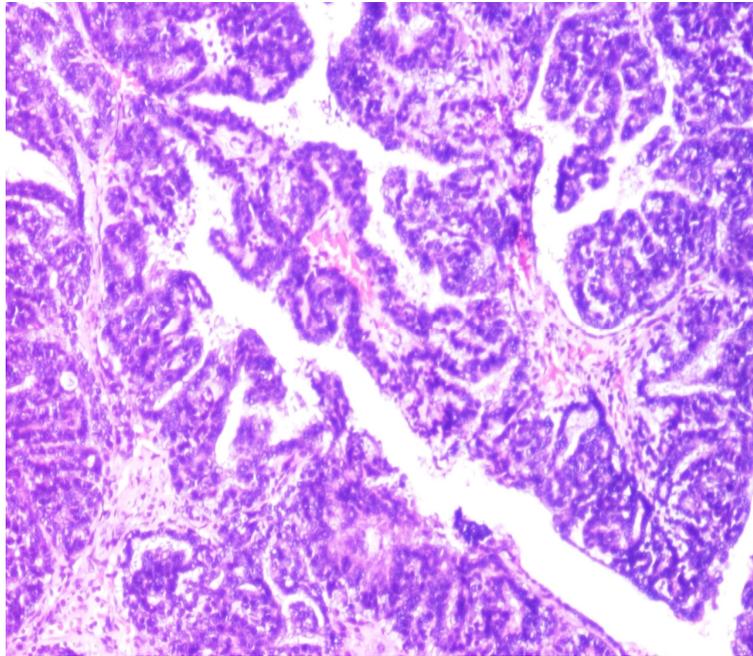
URL: <http://www.ajp.amjpathol.org/cgi/content/full/153/4/1041?>
28. Lieberman J. The ABCS of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003;5(3):361-70.
29. Padgett DA, Glaser R. How Stress influences the immune response. *TRENDS in immunology* August 2003; 24(8): 444-8
30. Russo-Marie F. Macrophages and the glucocorticoids. *J Neuroimmunol* 1992; 40: 281–6
31. Sanders VM and Kohm AP. Sympathetic nervous system interaction with the immune system. *Int Rev Neurobiol* 2002; 52: 17–41
32. Madden KS. Catecholamines, sympathetic innervation, and immunity. *Brain Behav Immun* 2003; 17 (Suppl 1): 5–10
33. Carrasco GA and Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* 2003; 463: 235–72
34. Goldfien A. Adrenal medulla. In: Greenspan FS and Gardner DG editors. *Basic and Clinical Endocrinology*. New York: Lange Medical Books, McGraw-Hill; 2001. p 399–421,
35. Murray MT. Echinacea: pharmacology and clinical applications. *Am J Nat Med* 1995;2:18-24.
36. Bauer R, Jurcic K, Puhlmann J, Wagner H. Immunological in vivo and in vitro examinations of echinacea extracts. *Arzneimittelforschung* 1988;38(2):276-81.
37. Schumacher A, Friedberg KD. Analysis of the effect of *Echinacea angustifolia* on unspecified immunity of the mouse. *Arzneimittelforschung* 1991;41:141-7.
38. Blumenthal M, Riggins C. Popular herbs in the U.S. market: therapeutic monographs. Austin, TX: American Botanical Council 1997:1-68.
39. Bartram T. *Encyclopedia of Herbal Medicine*. Grace Publishers, Dorset, England. 1995; 161-2.
40. Bauer R. Echinacea species as potential immunostimulatory drugs. *Econ Med Plant Res*. 1991; 5: 253-321.
41. Kligler B. Echinacea. *Am Fam Physician* 2003;67: 77-80.

42. Block KI, Mead MN .Immune system effects ofechinacea, ginseng, and astragalus :A review.Integr cancer Ther 2003;2:247-67
43. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-Adrenal axis and immunemediated inflammation.NEng Med J 1995;332:1351-1362
44. Lehmann C,Zeis M,Schmitz N, Uharek L. Impaired binding of perforin on the surfaceof tumor cells isa cause of target cell resistance againt cytotoxic effector cells. Blood. 2000;96:594-600.
45. Comprehensive practical approaches management of breast cancer , Surabaya 2004;28-29.
46. Brighthope I, Fitzgerald P. The AIDS Fighters. Keats Publishing,New Canaan, Conn 1987;10:134
47. 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.
48. Anonim. Cancer and the immune system : The vital connection. <http://www.cancerresearch.org/immunology/oncogen>. Diakses tanggal 14 Mei 2007
49. Fiebert SG, Kamper KJ. Echinacea (E. angustifolia, E. pallida, and E. purpurea), <http://www.mcp.edu/herbal/default.htm>. Diakses tanggal 28 Mei 2007
50. Anonim. Evidence-based complementary and alternative medicine, <http://ecam.oxfordjournal.org/cgi/content/full>. Diakses tanggal 24 Mei 2007
51. 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
52. Bratman S, Kroll D. Natural Health Bible. Prima Publishing. 1999: 179-81.
53. 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.
54. 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 Aug;13(8):487
55. Henneicke-von Z, Hentschel C, Schnitker J, Kohnen R, Kohler G, Wustenberg P. Efficacy and safety of a fixed combination phytomedicine in

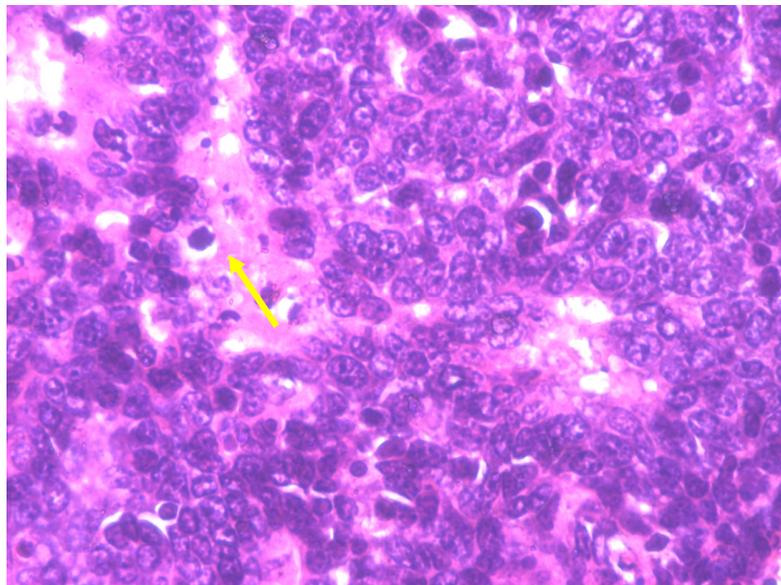
the treatment of the common cold (acute viral respiratory tract infection): results of a randomised, double blind, placebo controlled, multicentre study. *Curr Med Res Opin.* 1999; 15(3): 214-27.

56. 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 Nov 13;160(20):3141-3.
57. Tyler V. *Herbs of Choice.* Pharmaceutical Products Press, an imprint of The Haworth Press, Binghamton, NY. 1994; 12: 182-4.
58. Collins E, Berkoff N. *Everything You Need to Know About Echinacea and Immunity.* Roseville, CA:Prima Publishing;1999:85-6
59. Pratiknya AW. *Dasar-dasar Metodologi Penelitian kedokteran dan kesehatan.* Cetakan I. Jakarta: CV Rajawali, 1986: 147-65.
60. World Health Organization. *Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines.* 1993: 44.
61. Aihara M, Scardinon PT, Truong LD, Wheeler TM, Goad JR, Yang G. The frequency of apoptosis corellates with the prognosis of gleason grade 3 adenocarcinoma of the prostate. *J Cancer* 1995;75(2):523-9.
62. Elyana Asnar. *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*
63. Chandra Budiman. *Pengantar Statistik Kesehatan.* Jakarta: EGC, 1995: 1-96.
64. Munro BH. *Selected Non Parametric Techniques.* In: Munro BH ed. *Stasistical Methods for health Care Research.* Philadelphia: Lippincott-Raven Publisher, 1997: 99-121.
65. Sara G-Fiebert, Kathi J. Kamper, Echinacea (*E. angustifolia*, *E. pallida*, and *E. purpurea*), <http://www.mcp.edu/herbaldefault.htm>. Diakses tanggal 28 Mei 2007
66. Luetzig B. Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea*. *J Natl Cancer Inst.* 1989; 81: 669-75

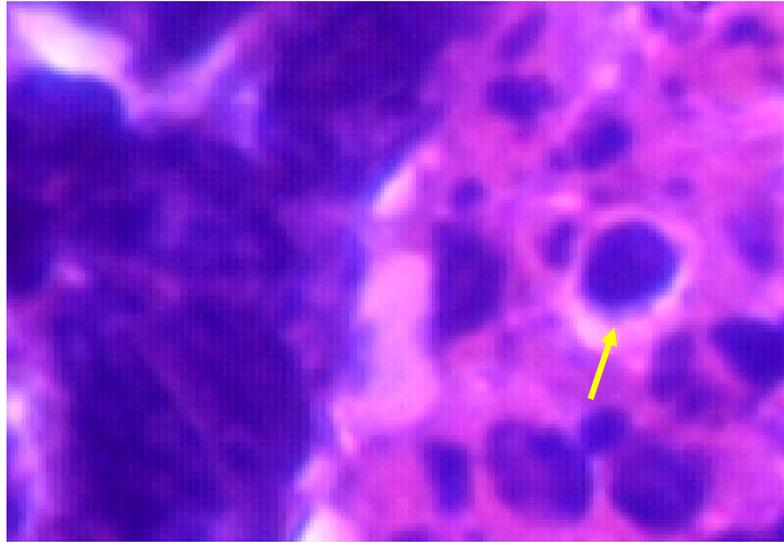
Lampiran



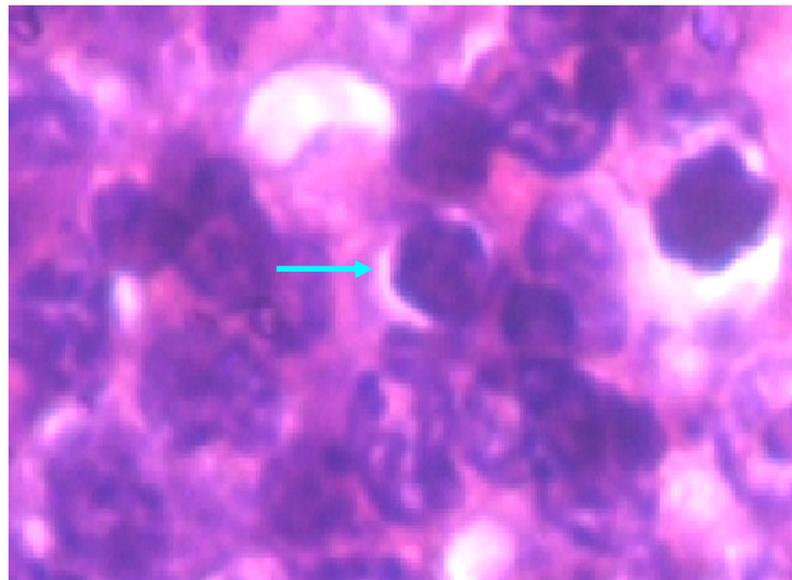
Pewarnaan HE sel tumor payudara dengan pembesaran 100X



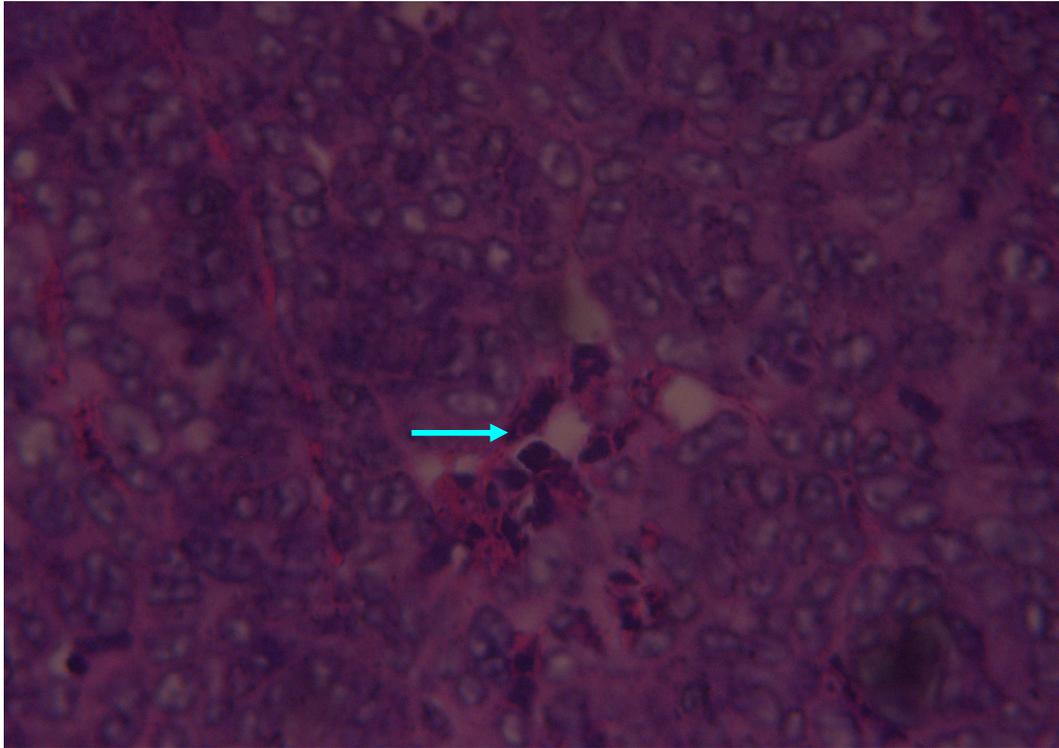
**Pewarnaan HE sel tumor payudara dengan pembesaran 400X
Tanda panah : Apoptotic Body (Halo dan inti basofilik)**



Tanda panah : *Apoptotic Bodies* (Inti basofilik dengan halo disekitarnya)



Tanda panah : *Apoptotic Bodies* (Inti basofilik dengan halo disekitarnya)



Tanda panah : Apoptotic body dengan inti yang fragmented



***ELISA MICROPLATE READER* untuk membaca absorbansi kadar TNF- α**



**Mouse TNF- α ELISA (BMS607/2and BMS607/2TEN) dengan nilai absorbance 450 nm
Di produksi oleh Bender MedSystems , Inc 849 Hinckley Road Burlingame, CA94010,USA.**

Explore

Klpk perlakuan

Case Processing Summary

| Klpk perlakuan | | Cases | | | | | |
|------------------|---------|-------|---------|---------|---------|-------|---------|
| | | Valid | | Missing | | Total | |
| | | N | Percent | N | Percent | N | Percent |
| Indeks apoptosis | kontrol | 6 | 100,0% | 0 | ,0% | 6 | 100,0% |
| | P1 | 6 | 100,0% | 0 | ,0% | 6 | 100,0% |
| | P2 | 6 | 100,0% | 0 | ,0% | 6 | 100,0% |
| Kadar TNF | kontrol | 6 | 100,0% | 0 | ,0% | 6 | 100,0% |
| | P1 | 6 | 100,0% | 0 | ,0% | 6 | 100,0% |
| | P2 | 6 | 100,0% | 0 | ,0% | 6 | 100,0% |

Tests of Normality

| Klpk perlakuan | | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|------------------|---------|---------------------------------|----|-------|--------------|----|------|
| | | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Indeks apoptosis | kontrol | ,238 | 6 | ,200* | ,902 | 6 | ,400 |
| | P1 | ,209 | 6 | ,200* | ,863 | 6 | ,246 |
| | P2 | ,153 | 6 | ,200* | ,956 | 6 | ,746 |
| Kadar TNF | kontrol | ,299 | 6 | ,100 | ,845 | 6 | ,177 |
| | P1 | ,209 | 6 | ,200* | ,893 | 6 | ,366 |
| | P2 | ,180 | 6 | ,200* | ,969 | 6 | ,860 |

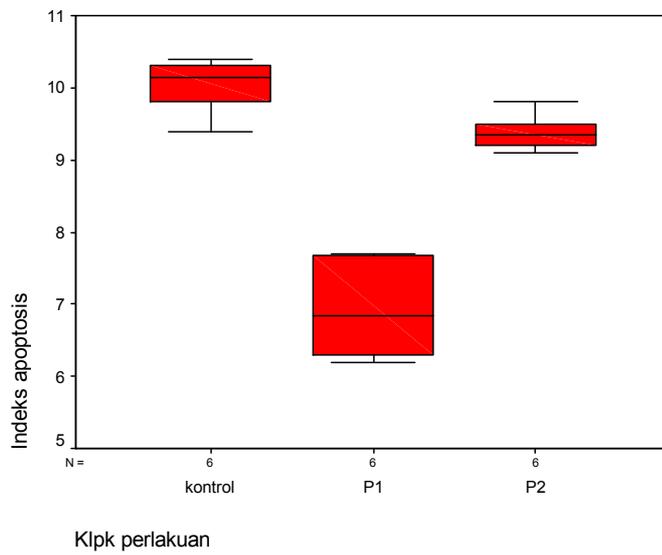
*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

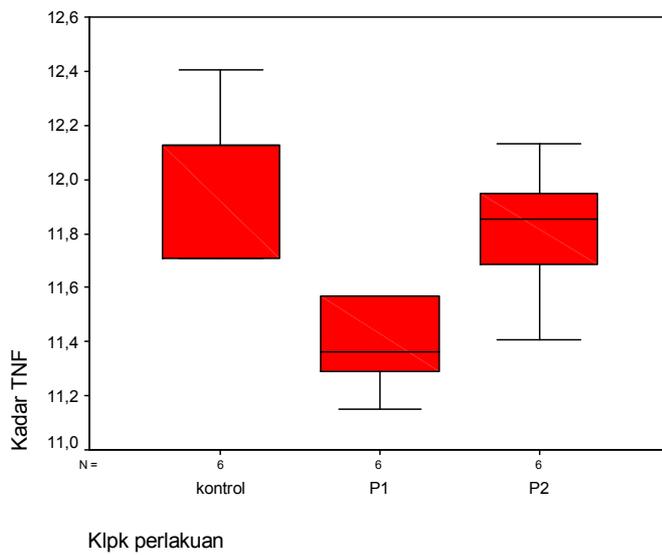
Descriptives

| Klpk perfakuan | | | | Statistic | Std. Error | |
|------------------|---------|----------------------------------|-------------|----------------------------------|------------|-----------|
| Indeks apoptosis | kontrol | Mean | | 10,0333 | ,1520 | |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | 9,6425 | | |
| | | | Upper Bound | 10,4241 | | |
| | | 5% Trimmed Mean | | 10,0481 | | |
| | | Median | | 10,1500 | | |
| | | Variance | | ,139 | | |
| | | Std. Deviation | | ,3724 | | |
| | | Minimum | | 9,40 | | |
| | | Maximum | | 10,40 | | |
| | | Range | | 1,00 | | |
| | | Interquartile Range | | ,6250 | | |
| | | Skewness | | -1,125 | ,845 | |
| | | Kurtosis | | ,586 | 1,741 | |
| | | P1 | | Mean | 6,9233 | ,2642 |
| | | | | 95% Confidence Interval for Mean | 6,2442 | |
| | | Lower Bound | 7,6025 | | | |
| | | Upper Bound | | | | |
| | | 5% Trimmed Mean | 6,9204 | | | |
| | | Median | 6,8350 | | | |
| | | Variance | ,419 | | | |
| | | Std. Deviation | ,6472 | | | |
| | | Minimum | 6,20 | | | |
| | | Maximum | 7,70 | | | |
| | | Range | 1,50 | | | |
| | | Interquartile Range | 1,4025 | | | |
| | | Skewness | ,289 | ,845 | | |
| | | Kurtosis | -1,861 | 1,741 | | |
| P2 | | Mean | 9,3833 | ,1014 | | |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | 9,1227 | | | |
| | | Lower Bound | 9,6439 | | | |
| | | Upper Bound | | | | |
| | | 5% Trimmed Mean | 9,3759 | | | |
| | | Median | 9,3500 | | | |
| | | Variance | 6,167E-02 | | | |
| | | Std. Deviation | ,2483 | | | |
| | | Minimum | 9,10 | | | |
| | | Maximum | 9,80 | | | |
| | | Range | ,70 | | | |
| | | Interquartile Range | ,4000 | | | |
| | | Skewness | ,871 | ,845 | | |
| | | Kurtosis | ,735 | 1,741 | | |
| Kadar TNF | kontrol | Mean | | 12,0335 | ,1118 | |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | 11,7462 | | |
| | | | Upper Bound | 12,3208 | | |
| | | 5% Trimmed Mean | | 12,0309 | | |
| | | Median | | 12,1263 | | |
| | | Variance | | 7,496E-02 | | |
| | | Std. Deviation | | ,2738 | | |
| | | Minimum | | 11,71 | | |
| | | Maximum | | 12,40 | | |
| | | Range | | ,70 | | |
| | | Interquartile Range | | ,4873 | | |
| | | Skewness | | -,219 | ,845 | |
| | | Kurtosis | | -1,079 | 1,741 | |
| | | P1 | | Mean | 11,3837 | 6,884E-02 |
| | | | | 95% Confidence Interval for Mean | 11,2068 | |
| | | Lower Bound | 11,5607 | | | |
| | | Upper Bound | | | | |
| | | 5% Trimmed Mean | 11,3863 | | | |
| | | Median | 11,3605 | | | |
| | | Variance | 2,843E-02 | | | |
| | | Std. Deviation | ,1686 | | | |
| | | Minimum | 11,15 | | | |
| | | Maximum | 11,57 | | | |
| | | Range | ,42 | | | |
| | | Interquartile Range | ,3133 | | | |
| | | Skewness | -,075 | ,845 | | |
| | | Kurtosis | -1,550 | 1,741 | | |
| P2 | | Mean | 11,8124 | ,1028 | | |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | 11,5481 | | | |
| | | Lower Bound | 12,0766 | | | |
| | | Upper Bound | | | | |
| | | 5% Trimmed Mean | 11,8173 | | | |
| | | Median | 11,8536 | | | |
| | | Variance | 6,341E-02 | | | |
| | | Std. Deviation | ,2518 | | | |
| | | Minimum | 11,40 | | | |
| | | Maximum | 12,13 | | | |
| | | Range | ,73 | | | |
| | | Interquartile Range | ,3792 | | | |
| | | Skewness | -,632 | ,845 | | |
| | | Kurtosis | ,470 | 1,741 | | |

Indeks apoptosis



Kadar TNF



Oneway

Test of Homogeneity of Variances

| | Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|------------------|-----|-----|------|
| Indeks apoptosis | 2,912 | 2 | 15 | ,085 |
| Kadar TNF | ,637 | 2 | 15 | ,543 |

ANOVA

| | | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|------------------|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Indeks apoptosis | Between Groups | 32,292 | 2 | 16,146 | 78,233 | ,000 |
| | Within Groups | 3,096 | 15 | ,206 | | |
| | Total | 35,388 | 17 | | | |
| Kadar TNF | Between Groups | 1,310 | 2 | ,655 | 11,777 | ,001 |
| | Within Groups | ,834 | 15 | 5,560E-02 | | |
| | Total | 2,144 | 17 | | | |

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

| Dependent Variable | | (I) Klpk perlakuan | (J) Klpk perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|--------------------|------------|--------------------|--------------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Indeks apoptosis | Bonferroni | kontrol | P1 | 3,1100* | ,2623 | ,000 | 2,4035 | 3,8165 |
| | | | P2 | ,6500 | ,2623 | ,077 | -5,6538E-02 | 1,3565 |
| | | P1 | kontrol | -3,1100* | ,2623 | ,000 | -3,8165 | -2,4035 |
| | | | P2 | -2,4600* | ,2623 | ,000 | -3,1665 | -1,7535 |
| | | P2 | kontrol | -,6500 | ,2623 | ,077 | -1,3565 | 5,654E-02 |
| | | | P1 | 2,4600* | ,2623 | ,000 | 1,7535 | 3,1665 |
| | Tamhane | kontrol | P1 | 3,1100* | ,2623 | ,000 | 2,1937 | 4,0263 |
| | | | P2 | ,6500* | ,2623 | ,019 | ,1120 | 1,1880 |
| | | P1 | kontrol | -3,1100* | ,2623 | ,000 | -4,0263 | -2,1937 |
| | | | P2 | -2,4600* | ,2623 | ,000 | -3,3645 | -1,5555 |
| | | P2 | kontrol | -,6500* | ,2623 | ,019 | -1,1880 | -,1120 |
| | | | P1 | 2,4600* | ,2623 | ,000 | 1,5555 | 3,3645 |
| Kadar TNF | Bonferroni | kontrol | P1 | ,6498* | ,1361 | ,001 | ,2830 | 1,0165 |
| | | | P2 | ,2211 | ,1361 | ,375 | -,1456 | ,5879 |
| | | P1 | kontrol | -,6498* | ,1361 | ,001 | -1,0165 | -,2830 |
| | | | P2 | -,4286* | ,1361 | ,020 | -,7953 | -6,1895E-02 |
| | | P2 | kontrol | -,2211 | ,1361 | ,375 | -,5879 | ,1456 |
| | | | P1 | ,4286* | ,1361 | ,020 | 6,190E-02 | ,7953 |
| | Tamhane | kontrol | P1 | ,6498* | ,1361 | ,003 | ,2591 | 1,0405 |
| | | | P2 | ,2211 | ,1361 | ,441 | -,2138 | ,6561 |
| | | P1 | kontrol | -,6498* | ,1361 | ,003 | -1,0405 | -,2591 |
| | | | P2 | -,4286* | ,1361 | ,022 | -,7927 | -6,4569E-02 |
| | | P2 | kontrol | -,2211 | ,1361 | ,441 | -,6561 | ,2138 |
| | | | P1 | ,4286* | ,1361 | ,022 | 6,457E-02 | ,7927 |

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

Correlations

Correlations

| | | Indeks apoptosis | Kadar TNF |
|------------------|---------------------|------------------|-----------|
| Indeks apoptosis | Pearson Correlation | 1,000 | ,695 |
| | Sig. (2-tailed) | , | ,001 |
| | N | 18 | 18 |
| Kadar TNF | Pearson Correlation | ,695 | 1,000 |
| | Sig. (2-tailed) | ,001 | , |
| | N | 18 | 18 |