

TESIS
PENGARUH PEMBERIAN TEH HIJAU TERHADAP
EKSPRESI PERFORIN DAN INDEKS APOPTOSIS
ADENOKARSINOMA MAMMA MENCIT C3H

THE INFLUENCE OF GREEN TEA IN PERFORIN
EXPRESSION AND APOPTOSIS INDEX OF C3H MICE
WITH BREAST CANCER



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

HENKY AGUNG NUGROHO

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

2009

Tesis

**PENGARUH PEMBERIAN TEH HIJAU TERHADAP
EKSPRESI PERFORIN DAN INDEKS APOPTOSIS
ADENOKARSINOMA MAMMA MENCIT C3H**

Disusun oleh

HENKY AGUNG NUGROHO

Telah dipertahankan pada tanggal September 2009 di depan tim penguji
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Pembimbing I

Pembimbing II

dr. Djoko Handoyo, SpB, SpB(K)Onk
NIP. 130 675 341

Prof.Dr.dr. I. Riwanto, SpB,SpB-KBD
NIP. 130 529 454

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. Winarto, SpMK,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, September 2009

Penulis

RIWAYAT HIDUP SINGKAT

A. IDENTITAS

Nama : dr. Henky Agung Nugroho
NIM Magister Biomedik : G4A002054
NIM PPDS I Bedah : G3A002006
Tempat / Tgl lahir : Sragen, 8 Mei 1975
Agama: : Islam
Jenis kelamin : Laki-laki
Istri : dr. Yetty Movieta Nancy, SpA

B. Riwayat Pendidikan

1. SD Randusari I, Semarang, Jawa Tengah : Lulus tahun 1987
2. SMPN I Solo, Jawa Tengah : Lulus tahun 1990
3. SMAN I Solo, Jawa Tengah : Lulus tahun 1993
4. FK Undip Semarang : Lulus tahun 2000
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 teh hijau terhadap ekspresi perforin dan indeks apoptosis adenokarsinoma mamma mencit C3H”

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, SpBOnk dan Prof. Dr. dr. I. Riwanto, SpB, SpB-KBD sebagai dosen pembimbing, penulis mengucapkan terima kasih atas bimbingan, sumbangan pikiran, serta kesabarannya dalam proses penyelesaian tesis ini.

Dalam kesempatan ini penulis juga menghaturkan terima kasih kepada :

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

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

Penulis menyadari bahwa penelitian ini masih jauh dari sempurna. Kritik dan saran demi kesempurnaan penelitian ini akan diterima dengan senang hati.

Penulis berharap penelitian ini dapat berguna bagi masyarakat serta memberi sumbangan bagi perkembangan ilmu kedokteran.

Semarang, September 2009

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP SINGKAT.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT.....	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.2. Perumusan masalah	4
1.3. Tujuan penelitian	4
1.4. Manfaat penelitian	5
1.5. Orisinalitas penelitian.....	6
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. Teh hijau	7

4.2. Sampel penelitian	40
4.3. Waktu dan lokasi penelitian.....	40
4.4. Variabel penelitian.....	41
4.5. Bahan dan alat penelitian.....	42
4.6. Prosedur Pemeriksaan.....	45
4.7. Pelaksanaan Penelitian.....	49
4.8 Alur Kerja.....	50
4.9. Cara Pengumpulan Data.....	51
4.10. Analisis Data.....	51
BAB 5. HASIL	52
BAB 6. PEMBAHASAN	56
BAB 7. SIMPULAN DAN SARAN	59
7.1. Simpulan	59
7.2. Saran	59
DAFTAR PUSTAKA.....	60
LAMPIRAN	67

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Perondaan imun untuk antigen tumor	10
Gambar 2. Reaksi immune T –cell mediated	16
Gambar 3. Tahapan sitolitik sel target oleh CTL.....	16
Gambar 4. Pengenalan sel target oleh sel-NK.....	21
Gambar 5. Jalur Kematian Sel Target.....	22
Gambar 6. Struktur kristal kimia dari Granzyme	24
Gambar 7. Jalur Apoptosis sel target	28
Gambar 8. Apoptosis sel target yang diinduksi oleh granzyme B	29
Gambar 9. Apoptosis sel target yang diinduksi oleh Granzyme A.....	30
Gambar 10. Nilai rata-rata hasil penghitungan ekspresi perforin.....	53
Gambar 11. Nilai rata-rata penghitungan indeks apoptosis.....	54
Gambar 12. Grafik korelasi antara ekspresi perforin dengan indeks Apoptosis.....	55

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Orisinalitas penelitian	6
--	---

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil pemeriksaan ekspresi perforin.....	67
Lampiran 2. Hasil pemeriksaan HE dan Apoptotic bodies.....	68

ABSTRAK

Latar belakang. Zat-zat immunomodulator banyak terdapat pada tanaman obat. Teh hijau pada beberapa penelitian terbaru dilaporkan mempunyai efek menghambat pertumbuhan sel kanker melalui proses apoptosis.

Tujuan. Membuktikan apakah teh hijau efektif meningkatkan respon imun melalui peningkatan ekspresi perforin dan indeks apoptosis sel adenokarsinoma mamma mencit C3H.

Metode. Penelitian menggunakan "*Post test only control group design*". Subyek penelitian adalah 15 ekor mencit yang mendapat 3 perlakuan yang berbeda. Kelompok I, mencit yang mendapat inokulasi sel kanker saja, kelompok II dan III adalah yang dinokulasi sel kanker kemudian diberikan teh hijau dengan dosis berbeda (0,65 dan 1,3 cc). Jaringan tumor dilakukan pewarnaan Hematoksilin Eosin, dan dihitung badan apoptotik dengan metode Aihara. Ekspresi perforin dinilai dengan menghitung jumlah sel limfosit disekitar sel kanker yang memproduksi perforin

HASIL. Kenaikan skor ekspresi perforin pada kontrol, perlakuan I, dan perlakuan II berturut-turut adalah 3,34 ; 7,42 dan 9,66 sedangkan untuk indeks apoptosis 7,9 ; 10,98 dan 12,12 ($p = 0,001$). Hubungan dengan uji korelasi Pearson, didapatkan skor 0.793 ($p=0.001$)

Kesimpulan. Teh hijau dapat memacu peningkatan ekspresi perforin dan apoptosis. Terdapat korelasi yang cukup kuat antara peningkatan skor perforin dan indeks apoptosis

Keyword: Teh hijau, adenokarsinoma mamma, ekspresi perforin, indeks apoptosis.

ABSTRACT

Background. Many immunomodulator substances are found in herbal medicines such as green tea. This leaf in many studies showed good effect to immune system and has capability to block the growth of cancer cell through apoptosis process.

Objective. To know the effectiveness of green tea to immune system by enhancing perforin expression and apoptosis index of C3H mice with breast cancer.

Methods. *Post test only control group design* in 15 C3H mice divided into 3 groups. The first group, mice with cancer cell inoculation only (control group), the second and third group were given different doses of green tea (0,65 and 1,3 cc). Tissue material was stained with Haematoxylin Eosin and apoptotic bodies were measured by Aihara method. Perforin expression was assessed with lymphocyte count around cancer cell that produce perforin. Pearson test was applied between the variables.

Result. Perforin expression score in control group, group I and group II are 3,34; 7,42 and 9,66 respectively whereas the apoptosis index are 7,9; 10,98; 12,12 ($p=0,001$). Correlation (Pearson) between perforin expression and apoptosis index were 0,793 ($p=0,001$).

Conclusion. Green tea could enhance perforin expression and apoptosis index. There is a strong correlation between perforin expression and apoptosis index.

Keyword: Green tea, breast cancer, perforin expression, apoptosis index.

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG

Insiden kanker payudara relatif tinggi yaitu sebesar 20% dari seluruh keganasan. Lebih kurang 600.000 kasus kanker payudara baru didiagnosa setiap tahun dan diantaranya ditemukan 350.000 kasus lainnya ditemukan dinegara maju, sedangkan 250.000 kasus di negara berkembang.¹ Pada tahun 1994, Badan Registrasi Kanker Ikatan Ahli Patologi Indonesia (BRK-IAPI), memublikasikan data bahwa frekwensi kanker payudara pada wanita di Indonesia (11,77%) menduduki urutan kedua tertinggi setelah kanker rahim (17,70%), dari seluruh kasus kanker pada seluruh pusat Patologi Anatomi di Indonesia². Di Semarang pada tahun 2005, ditemukan kasus kanker payudara sebanyak 749 kasus dan insiden ini berada pada urutan tertinggi kedua setelah kanker mulut rahim.³ Insiden puncak pada kelompok umur 45-54 tahun.⁴

Cara pengobatan kanker payudara yang berlaku selama ini adalah dengan pembedahan, radioterapi dan sitostatika. Pembedahan dan radioterapi bersifat terapi definitif lokal, sedangkan secara sistemik, di mana sel kanker menyebar/metastasis dilakukan dengan sitostatika. Sitostatika pada kanker payudara dilakukan dalam bentuk regimen yang mempunyai angka keberhasilan didasarkan evaluasi pada *objective response rate* pasca kemoterapi (*Partial Response* dan *Complete Response – CR/PR*). Sitostatika untuk kanker payudara ini diberikan dalam berbagai regimen dengan CR/PR hanya berkisar antara 22% - 70%, tetapi obat ini mempunyai efek toksis terhadap hepar, ginjal, jantung, dan

organ-organ lain tubuh, serta immunosupresi.⁵ Terapi lain kanker adalah dengan terapi hormonal, tetapi hal ini akan tidak berhasil bila reseptor hormon pada sel tumornya negatif atau sel kankernya bersifat *hormonal independent*. Saat ini sedang dikembangkan terapi baru pada kanker yaitu Imunoterapi, yaitu dengan memodulasi sistem kekebalan tubuh terhadap tumor, yang diharapkan dapat membunuh sel-sel kanker yang tersebar secara sistemik setelah terapi definitif lokal dilakukan. Zat-zat immunomodulator banyak terdapat pada tanaman obat.⁶ Oleh karena itu saat ini sedang dicari terapi alternatif dari tanaman obat yang dapat memodulasi sistem imun terhadap sel kanker, bahkan bila ada, dicari tanaman obat yang dapat bersifat sitostatika tetapi juga sebagai immunomodulator, atau minimal tidak menyebabkan immunosupresi.

Teh hijau yang mempunyai nama lain *Camellia sinensis* merupakan minuman tradisional yang sejak lama telah digunakan di cina dan jepang. Dari beberapa penelitian terakhir dilaporkan mempunyai efek menghambat pertumbuhan sel kanker dan dapat menyebabkan apoptosis dari sel kanker, sebagai tumor antiangiogenesis, dan dapat menstimulasi sistem kekebalan tubuh. Pada beberapa penelitian terbukti memiliki efek anti karsinogenesis di hepar pada fase promosi.⁷⁻⁹

Sebuah penelitian di Harvard Medical School, Boston oleh Arati B.Kamath dkk, menemukan bahwa Teh hijau dapat menjadi imunostimulator, di mana Teh hijau mengandung L-theanin (precursor antigen ethylamine non-peptid) yang dapat memacu sel-T untuk memproduksi interferon- γ (IFN- γ) dan Tumor Necrosis Factor (TNF) sampai 10 kali lipat. Dengan peningkatan ekskresi IFN- γ dan TNF oleh sel-T helper, akan meningkatkan ekspresi Major Histocompatibility

Complex (MHC) kelas 1 sel tumor yang kemudian sel tersebut akan mudah dikenali dan dilisis oleh sel Cytotoxic T-Lymphocyte (CTLs). Peningkatan IFN- γ dan TNF juga akan memacu aktivitas tumorisidal Natural Killer (NK) sel untuk mengenali dan melisis sel tumor tersebut¹⁰⁻¹²

Respon imun merupakan hasil interaksi antara antigen dengan sel-sel pada imunokompeten, termasuk mediator-mediator yang dihasilkannya. Fungsi utama respon imun adalah untuk membedakan antara *self* (milik tubuh sendiri) dengan *non self*, seperti halnya mikroorganisme patogen, tumor, jaringan yang dicangkokkan, atau substansi lain yang masuk dalam tubuh. Pada dasarnya respon imun terdiri dari 3 fase: kognitif, aktivasi, efektor. Respon imun terutama tergantung pada tiga tipe sel yaitu makrofag, limfosit T dan limfosit B.¹³⁻¹⁶

Sel imun yang berperan dalam perondaan imun terhadap kanker adalah sel limfosit T sitotoksik (CTL), Sel NK (*Natural Killer*) dan makrofag. Setelah sel kanker dikenal sebagai sel asing, ketiga sel imun tersebut akan menghancurkan sel kanker. Sel CTL dan sel NK melakukan cara sitotoksitas yang sama yaitu dengan mengeluarkan perforin, sedangkan makrofag menggunakan cara fagositosis. Perforin yang dihasilkan CTL dan sel NK dapat menginduksi aktivasi caspase, sehingga sel tumor akan mengalami apoptosis. Perforin dapat digunakan sebagai marker dari sel yang bersifat sitotoksik yaitu CTL dan sel NK.^{13,16-20}

Belum ada studi yang memperlihatkan aktivitas *killing* CTL dan sel-NK terhadap sel tumor payudara dengan melihat ekspresi perforin yang dihasilkan akibat dari pemberian teh hijau. Dalam penelitian ini akan dilihat efek Teh hijau dalam memodulasi sistem imun dan pengaruhnya terhadap apoptosis sel tumor kelenjar susu pada mencit C3H. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat

mendukung penggunaan teh hijau sebagai salah satu *adjuvant* kemoterapi terhadap kanker .

1.2. PERUMUSAN MASALAH

Dari hal-hal yang tersebut di atas maka dapat kami rangkum beberapa permasalahan yaitu :

- 1.2.1. Apakah terdapat perbedaan indeks apoptosis pada mencit C3H yang menderita adenokarsinoma mamma yang diberi teh hijau dibanding yang tidak diberi ?
- 1.2.2. Apakah terdapat perbedaan ekspresi perforin pada mencit C3H yang menderita adenokarsinoma mamma yang diberi teh hijau dibanding yang tidak diberi?
- 1.2.3 Apakah terdapat korelasi antara skor perforin dengan indeks apoptosis pada mencit C3H yang mendapat teh hijau?

1.3. TUJUAN PENELITIAN

1.3.1. Tujuan umum :

Membuktikan bahwa teh hijau efektif dalam upaya meningkatkan respon imun pada adenokarsinoma mamma mencit C3H.

1.3.2. Tujuan khusus :

- 1.3.2.1. Membuktikan indeks apoptosis sel adenokarsinoma mamma mencit C3H pada kelompok yang diberi teh hijau lebih tinggi dibanding kelompok yang tidak diberi teh hijau
- 1.3.2.2. Membuktikan ekspresi perforin sel mononuklear (disekitar jaringan adenokarsinoma payudara mencit C3H) pada kelompok yang diberi teh hijau lebih tinggi dibanding kelompok yang tidak diberi teh hijau.
- 1.3.2.3. Menganalisis korelasi antara ekspresi perforin dengan indeks apoptosis sel adenokarsinoma mammae pada mencit C3H yang diberi teh hijau.

1.4. MANFAAT PENELITIAN

Apabila teh hijau pada penelitian ini terbukti dapat meningkatkan aktifitas sel mononuklear dalam menghambat pertumbuhan adenokarsinoma payudara mencit C3H, maka Teh hijau dapat dimanfaatkan sebagai kemoprevensi terhadap penderita dengan resiko tinggi kanker payudara. Diharapkan Teh hijau ini dapat menjadi obat sinergi terhadap sitostatika yang sudah ada pada saat ini.

Dengan adanya penelitian ini akan menambah khasanah ilmu baik di bidang onkologi, imunologi, dan di bidang *herbal medicine*. Sumbangan ilmu terutama di bidang Imunologi, dalam kaitan sistem *cell mediated immune respons* terhadap sel tumor.

Bila memang terbukti efektif dalam meningkatkan aktifitas *killling* CTL dan sel NK terhadap sel tumor, maka dapat dilakukan penelitian lebih lanjut tentang profil molekuler dari teh hijau untuk keperluan sitostatika.

1.5. ORISINALITAS PENELITIAN

Tabel 1. Orisinalitas Penelitian

Penulis	Judul / penerbit	Hasil
Kamath BA ¹⁰	Antigen in Tea-Beverage Prime Human T-cells in Vitro and in Vivo for Memory and Non Memory Antibacterial Cytokine Response. National Jewish Medical and Research Center, Denver. Published Online by PNAS Online. March 2003 Vol.100. no. 10 : 6009-14	Penelitian in vivo, dimana teh hijau memacu sel T memproduksi interferon- γ (IFN- γ) dan TNF sampai 10 kali lipat
Zhao X, Tian H ²¹	Epigallocatechin gallate, the main ingredient of tea induces apoptosis in breast cancer cells. Front Biosci; 2006. p. 2428-33	Jumlah apoptosis dan aktifitas caspase yang diinduksi oleh EGCG tergantung waktu dan dosis
Wiratno (Disertasi Doktor UNDIP) ²²	Pengaruh polifenol teh hijau terhadap jumlah monosit dan limfosit serta fungsinya dalam memproduksi TNF- α dan IL-2 pada penderita karsinoma nasofaring yang mendapat radioterapi	Polifenol teh hijau potensial mencegah efek immunosupresi dari radioterapi.

Penelitian ini berbeda dengan penelitian-penelitian tersebut dalam hal teh hijau yang diberikan berupa teh hijau dalam bentuk sachet dan targetnya adalah adenokarsinoma mamma pada mencit C3H dengan menghitung indeks apoptosis dan ekspresi perforin

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Teh hijau

Teh hijau yang mempunyai nama *botanical Camellia sinensis*. Dikenal juga dengan nama *Chinesse tea, green tea extract, Black tea, green tea polyphenols, Camellia theifera, Thea sinensis, Thea bohea, Thea viridis*. Di legenda Cina disebutkan bahwa teh tersebut ditemukan dengan tidak sengaja oleh kaisar 4000 tahun yang lalu. Sejak saat itu, pengobatan tradisional cina menganjurkan teh hijau untuk dipakai sebagai obat sakit kepala, nyeri, depresi, detoksifikasi, penambah energi, dan sebagai obat untuk meningkatkan daya tahan tubuh serta memperpanjang umur.⁹

Teh hijau mengandung bahan-bahan seperti Proanthocyanidins (tannins), Polyphenols (Gallic acid dan catechins : gallocatechin (GC), epigallocatechin (EGC), epicatechin (EC), dan epigallocatechin gallate (EGCG)), Caffein, Flavonoid, Methylxanthines (tehophylline, tehobromine, dan *L-tehanine*), Polisakarida, Vitamin (Asam askorbat, tocopherol), fluoride, chlorophyll, dan asam organik⁹

Absorpsi teh hijau sangat baik secara oral, dan bahan aktif catechin dan polyphenol dapat ditemukan di darah, saliva, urin, dan feses. Ini mengindikasikan bahwa metabolit teh hijau dapat mencapai semua jaringan.⁹

Divisi Imunologi Harvard Medical School, Boston, melakukan penelitian terhadap 21 sukarelawan, dengan diberikan intake teh hijau (merk Lipton) 500-

600 ml/hari selama 2 – 4 minggu, dilaporkan bahwa teh hijau mempunyai efek imunostimulator yang dapat memacu sel-T untuk memproduksi interferon- γ (IFN- γ) atau Tumor Necrosis Factor (TNF) sampai 10 kali lipat.¹⁸ Dengan disekresinya IFN- γ dan TNF oleh sel-T helper, maka akan meningkatkan ekspresi Major Histocompatibility Complex (MHC) kelas 1 sel tumor yang kemudian sel tersebut akan mudah dikenali dan dilisis oleh sel Cytotoxic T-Lymphocyte (CTLs). Peningkatan IFN- γ dan TNF juga akan memacu aktivitas tumoricidal Natural Killer (NK) sel untuk mengenali dan menginduksi sel tumor tersebut untuk terjadinya proses apoptosis.^{10,13}

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.^{13,21} 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.^{13,23}

Induksi limfosit T dalam respon imun hampir selalu bersifat makrofag “dependent” dimana makrofag berfungsi untuk memproses *antigen*.^{13,23}

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 :

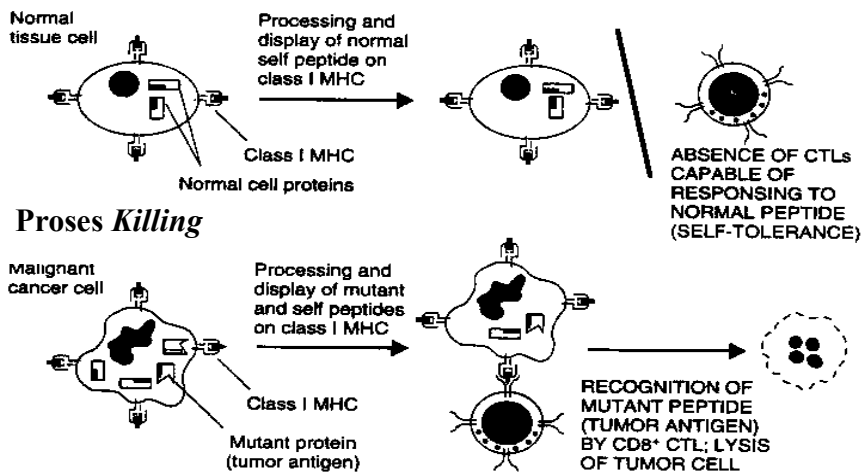
- Tumor-specific antigens (TSAs)

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 diekspresikan bersama 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 diendositososis oleh APCs dan diekspresikan sebagai MHC tipe II yang akan dikenali oleh limfosit T Helper CD4.^{13,23} (Gambar-1).



Gambar-1. Perondaan imun untuk antigen tumor oleh CTLs melalui MHC type I.¹³

(Dimodifikasi dari : Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: WB Saunders Co. 2005)

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.^{13,25}

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.¹³

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.^{13,25} Hubungan antara banyaknya limfosit yang ditemukan diantara kelompok sel kanker secara histopatologi 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^{13,25,27}.

Sel CTL dan sel NK melakukan cara sitotoksisitas yang sama yaitu dengan mengeluarkan perforin, sedangkan makrofag menggunakan cara fagositosis^{13,25}.

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.^{13,23}

Komponen efektor pada sistem imun yang memiliki kemampuan bereaksi dengan sel tumor ialah limfosit T, *antibody-dependent cerllular cytotoxicity* (ADCC), sel NK dan makrofag.¹³

2.2.2. Mekanisme efektor dalam melawan tumor

2.2.2.1. Peran makrofag dalam respon antitumor.

Makrofag 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.¹³

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.¹³

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, sesuai namanya mampu melisis sel tumor melalui cara :

- 1) TNF berikatan dengan reseptor permukaan dari sel tumor dan secara langsung melisis sel tumor.
- 2) TNF dapat menyebabkan nekrosis dari sel tumor dengan cara memobilisasi berbagai respon imun tubuh.¹³

2.2.2.2 Antibodi yang diproduksi limfosit B

Selain limfosit B berperan dalam membentuk antibodi spesifik terhadap antigen tumor, juga berperan dalam mengikat, memproses dan mempresentasikan antigen tumor untuk menginduksi sel Th agar menghasilkan respon pada sel tumor. Fungsi yang terakhir disebutkan adalah kapasitas limfosit B sebagai *Antigen Presenting Cells* (APC).²¹ Meskipun pada tumor, imunitas selular lebih banyak berperan daripada imunitas humoral, tetapi tubuh membentuk juga antibodi terhadap antigen tumor. Antibodi tersebut ternyata dapat menghancurkan sel tumor secara langsung atau dengan bantuan komplemen, atau melalui sel Efektor ADCC yang memiliki reseptor Fc misalnya sel K dan makrofag (opsonisasi) atau dengan jalan mencegah adhesi sel tumor. Pada penderita kanker sering ditemukan kompleks imun, tetapi pada kebanyakan kanker sifatnya masih belum jelas.

Antibodi diduga lebih berperan terhadap sel yang bebas (leukemia, metastase tumor) dibanding terhadap tumor yang padat, mungkin dengan membentuk kompleks imun, dengan demikian mencegah sitotoksitas sel T.¹³

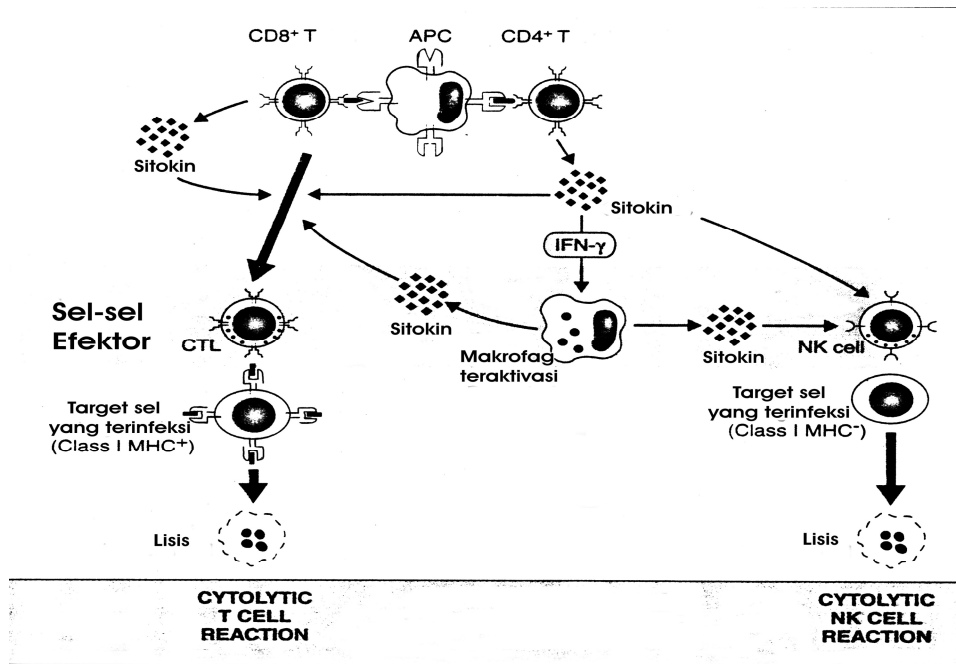
2.2.2.3 Limfosit T sebagai Efektor anti tumor

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 mengaktivasi 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).^{13,24}

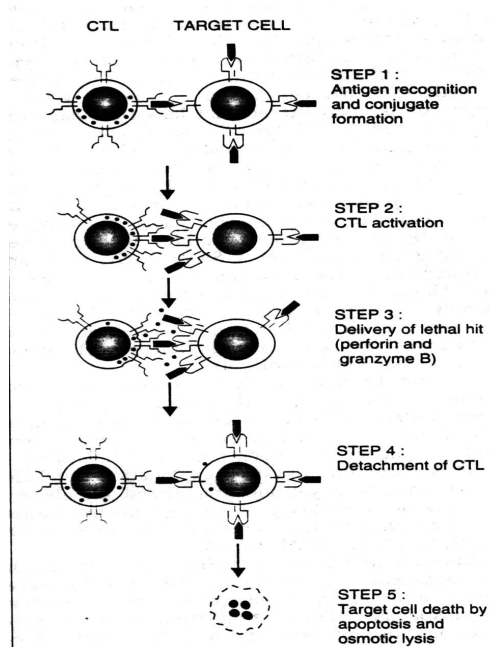
Pada banyak penelitian terbukti bahwa sebagian besar sel efektor yang berperan dalam mekanisme anti tumor adalah sel T CD8, yang secara fenotip dan fungsional identik dengan CTL yang berperan dalam pembunuhan sel yang terinfeksi virus atau sel *alogenik*. CTL dapat melakukan fungsi *surveillance* dengan 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. Ada juga kemungkinan bahwa sel CD4⁺ yang spesifik tumor meningkatkan respon *Delayed Type Hypersensitivity* (DTH) terhadap

tumor.(Gambar-2) Sebagian kecil tumor yang mengekspresikan MHC kelas II dapat mengaktivasi 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.¹³ Proses sitolitik CTLs terhadap sel target dengan mengaktifkan penggunaan enzim perforin dan granzyme, ada beberapa langkah proses sitolitik CTL terhadap sel target.¹³ (Gambar – 3)



Gambar 2. Reaksi immune T-Cell mediated.¹³

(Dimodifikasi dari : Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: WB Saunders Co. 2005)



Gambar 3. Tahapan sitolitik sel target oleh CTL.¹³

(Dimodifikasi dari : Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: WB Saunders Co. 2005)

2.2.2.4. Sel Natural Killer (NK) sebagai efektor anti tumor

Sel NK merupakan komponen utama dari *immune surveillance*, yang dapat bekerja sebagai sel efektor dari imunitas natural maupun spesifik / adaptif. Mekanisme Efektor sel NK mirip dengan sel T- sitotoksik (CD8), yang membedakan adalah bahwa sel NK melakukan sitotoksitas terhadap sel tumor tanpa melalui ekspresi antigen tumor bersama molekul MHC kelas I “(MHC-unrestricted manner)”. Secara *in vitro*, sel NK dapat melisis sel terinfeksi virus dan *cell line* dari tumor terutama tumor hematopoetik. Sebagian dari populasi sel NK dapat melisis sel target yang diopsonisasi oleh antibodi, terutama dari kelas IgG karena sel NK memiliki reseptor FcγRIII atau CD16 untuk Fc dari IgG. Kapasitas tumorisidal dari sel NK akan ditingkatkan oleh berbagai *sitokin*, diantaranya IFN, TNF, IL-2 dan IL-12. Konsep ini diadaptasikan dalam imunoterapi tumor menggunakan LAK (*Lymphokine-activated Killer*), yaitu sel mononuklear perifer yang dikultur secara *in vitro* dengan penambahan IL-2 dosis tinggi.^{13,28}

Sitotoksitas alami yang diperankan oleh sel NK merupakan mekanisme efektor yang sangat penting dalam melawan tumor. Sel NK adalah sel efektor dengan sitotoksitas spontan terhadap berbagai jenis sel sasaran; sel-sel efektor ini tidak memiliki sifat-sifat klasik dari makrofag, granulosit maupun CTL, dan sitotoksitasnya tidak bergantung pada MHC.²⁹

Sel NK dapat berperan baik dalam respons imun nonspesifik maupun spesifik terhadap tumor, dapat diaktivasi langsung melalui pengenalan antigen tumor atau sebagai akibat aktivitas sitokin yang diproduksi oleh limfosit T

spesifik tumor. Mekanisme lisis yang digunakan sama dengan mekanisme yang digunakan oleh sel T CD8⁺ untuk membunuh sel, tetapi sel NK tidak mengekspresikan TCR dan mempunyai rentang spesifisitas yang lebar. Sel NK dapat membunuh sel terinfeksi virus dan sel-sel tumor tertentu, khususnya tumor hemopoetik, *in vitro*. Sel NK tidak dapat melisiskan sel yang mengekspresikan MHC, tetapi sebaliknya sel tumor yang tidak mengekspresikan MHC, yang biasanya terhindar dari lisis oleh CTL, justru merupakan sasaran yang baik untuk dilisiskan oleh sel NK. Sel NK dapat diarahkan untuk melisiskan sel yang dilapisi *imunoglobulin* karena ia mempunyai reseptor Fc (FcRIII atau CD 16) untuk molekul IgG.¹ Disamping itu penelitian-penelitian terakhir mengungkapkan bahwa pengikatan sel NK pada sel sasaran juga dapat terjadi melalui reseptor khusus yang berbeda dengan reseptor Fc, yaitu reseptor NKR-P1, yang mengikat molekul semacam lektin.²⁹

Aktivitas sel NK dihambat oleh antigen HLA-G, apabila diekspresikan oleh sel tumor, mengakibatkan sel tumor terhindar dari upaya lisis oleh sel NK. Walaupun antigen HLA-G jarang diekspresikan pada tumor, transkripnya berupa mRNA cukup sering dijumpai pada berbagai jenis tumor, sehingga diduga ekspresi antigen HLA-G dikontrol ditingkat pasca transkripsi. Apabila tumor tidak mengekspresikan antigen HLA-G, sulit baginya untuk menghindarkan lisis oleh sel NK, sekalipun tumor telah berupaya menghindar dari lisis oleh sel T sitotoksik dengan tidak mengekspresikan antigen MHC yang lain²⁹.

Kemampuan sel NK membunuh sel tumor ditingkatkan oleh sitokin, termasuk IFN, TNF, IL-2 dan IL-12. Karena itu peran sel NK dalam aktivitas anti tumor bergantung pada rangsangan yang terjadi secara bersamaan pada sel T dan makrofag yang memproduksi sitokin tersebut¹. Ketiga jenis IFN (α, β, γ) dapat meningkatkan fungsi sel NK. IFN mengubah pre-NK menjadi sel NK yang mampu mengenal dan melisis sel sasaran, mempermudah interaksi dengan antigen tumor dan lisis sel sasaran.⁹ Sel NK mungkin berperan dalam *immune surveillance* terhadap tumor yang sedang tumbuh, khususnya tumor yang mengekspresikan antigen virus.¹ Aktivitas sel NK sering dihubungkan dengan prognosis. Beberapa penelitian mengungkapkan bahwa ada korelasi antara penurunan kemampuan sitotoksitas sel NK dengan peningkatan resiko metastasis. Dari penelitian-penelitian itu disimpulkan bahwa sitotoksitas alami dapat berperan dalam mencegah pertumbuhan kanker dan metastasis.²⁹ (Gambar-4).

Yang menarik adalah peran sel NK yang diaktifkan dengan stimulasi IL-2 dalam membunuh sel tumor. Sel-sel itu yang disebut *lymphokine activated killer cells* (LAK cells) dapat diperoleh *in vitro* dengan memberikan IL-2 dosis tinggi pada biakan sel-sel limfosit darah perifer atau sel-sel *Tumor Infiltrating Lymphocytes* (TIL) yang berasal dari penderita kanker. Sel-sel yang diaktifkan oleh limfokin (LAK cells) menunjukkan peningkatan aktivitas sitotoksik yang sangat jelas. Besar kemungkinan bahwa sel LAK dapat digunakan dikemudian hari dalam imunoterapi adaptif.^{13,28}

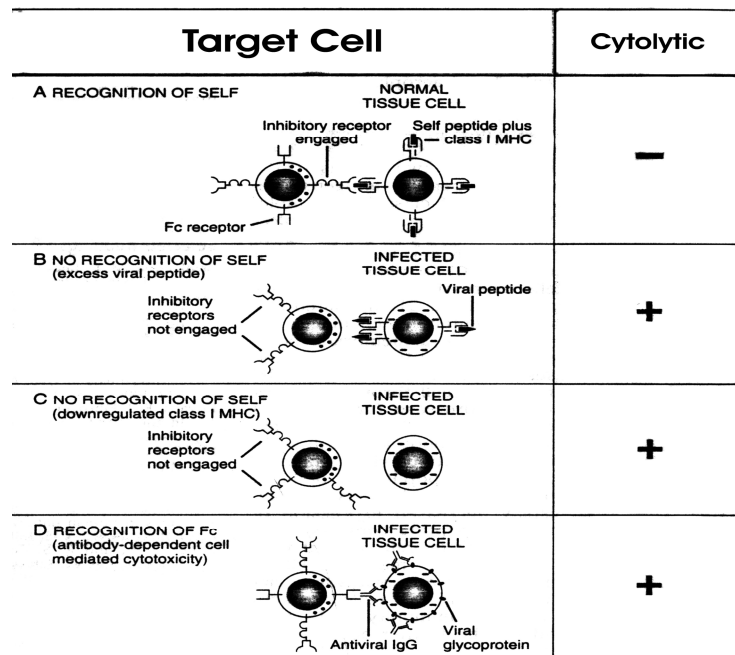
Sel NK juga mempunyai peran penting dalam mencegah metastasis dengan mengeliminasi sel tumor yang terdapat dalam sirkulasi. Hal itu

dibuktikan dengan berbagai penelitian. Salah satu diantaranya mengungkapkan bahwa 90-99% sel tumor yang dimasukkan intravena akan hilang dalam 24 jam pertama, dan hal ini mempunyai hubungan bermakna dengan jumlah dan aktivitas sel NK. Percobaan menggunakan NK yang diaktivasi dengan cyclophosphamide (cy) menunjukkan bahwa sel-sel itu gagal mencegah metastasis.²⁹

Setelah mengenal sel tumor dengan caranya masing-masing, CTL dan sel NK melepas granula azurofilik. Granula ini akan menyelubungi sel target, kemudian akan bersatu dengan membrane sel target (*eksositosi*).^{13,30} Granula CTL dan sel NK mengandung *perforin*, *sitotoksin*, *serine esterase (granzyme)* dan *proteoglikan*.^{13,31} Perforin akan menimbulkan lubang pada membran sel target (sel tumor), dimana lubang tersebut merupakan pintu masuk bagi molekul sitotoksik lainnya dalam sitoplasma dan inti sel yang menyebabkan kematian dari sel target.^{13,20,30-32}

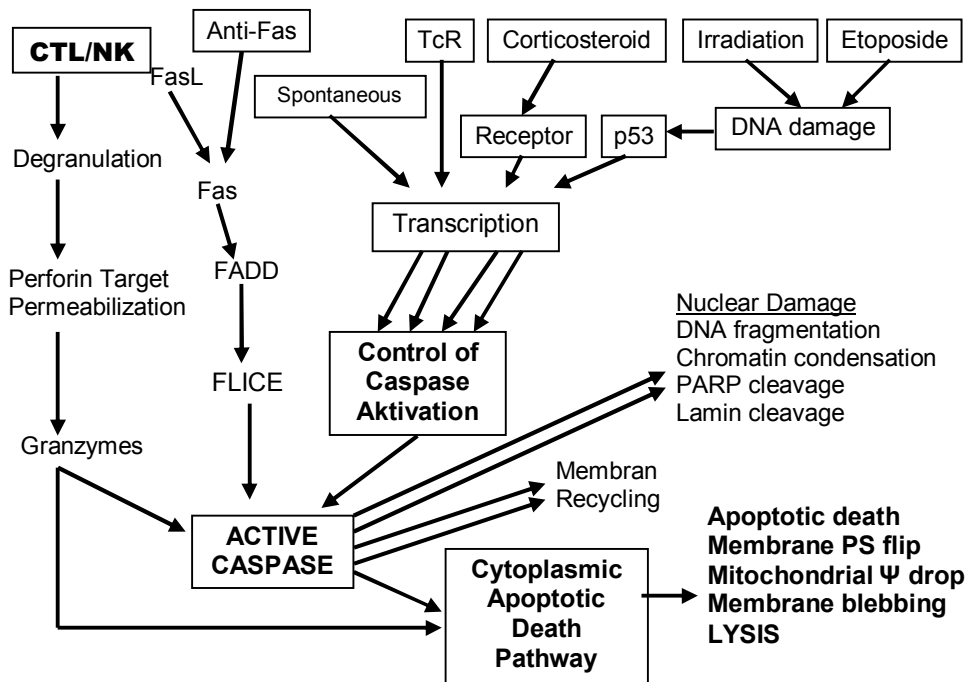
Dalam membunuh sel target ini melibatkan ekspresi permukaan FAS Ligan yang dipengaruhi reseptor, yang dapat mengakibatkan *cross link* sel target sehingga memicu kematian endogen (dikaitkan dengan apoptosis)^{17,29,30} secara bersama-sama jalur granula (*eksositosi* dan FASL). Granzym akan mengaktifkan procaspase endogen pada sel target. Aktifitas *caspase* merupakan bagian dari jalur kematian *apoptotic* pada umumnya. *Inhibitor caspase* akan menghambat *apoptosis* dari jalur rusaknya nucleus; tetapi tidak menghambat apoptosis karena kerusakan yang bukan dari kerusakan inti tetapi hilangnya mitokondria potensial.¹⁷ CTL dan sel NK tidak akan terlis

oleh perforinnya sendiri yang lepas karena ikatan antara CTL dan NK lemah terhadap perforin (oleh karena histon H2B)³¹. (Gambar-5)



Gambar-4. Pengenalan sel target oleh sel-NK.¹³

(Dimodifikasi dari : Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: WB Saunders Co. 2005)



Gambar-5. Jalur Kematian Sel Target yang dipengaruhi oleh CTL/NK¹⁵
 (Dimodifikasi dari : Ladish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky S, Lawrence, Matsudaira P, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. 3rd ed. New York: Scientific American Books; 1996).

2.2.2.5 *Perforin*

Setelah CTL/sel-NK mengenali target sel spesifik, terjadi ikatan (synapse) dalam dua domain, yang pertama adalah ikatan signal *signaling domain* dan yang lainnya adalah *secretory domain*. Synapse ini sangat kuat untuk mencegah kebocoran molekul sitolitik yang disekresikan ke sel target, tetapi pada keadaan aktivasi CTL/sel-NK yang kuat akan terjadi kebocoran juga. Hal ini yang dapat kita ukur dalam darah (nMol) atau pada jaringan dengan pengecatan Imunohistokimia sebagai indikator aktifitas CTL/sel-NK.

Perforin sangat diperlukan untuk membuka jalan agar granzyme sampai ke sitosol. Pada model yang terdahulu, perforin mengalami reaksi homopolimerasi pada membran plasma dengan bantuan ion Ca^{2+} untuk

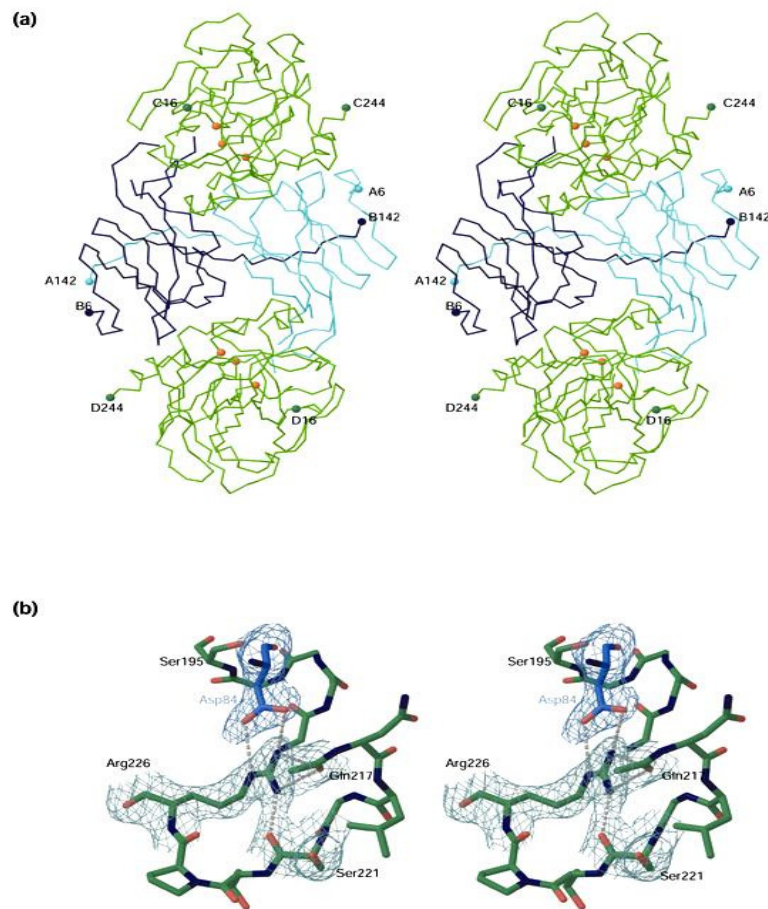
membuat lubang pada membran plasma, lubang yang terbentuk untuk dapat bisa memasukkan granzyme diameternya \pm 50 nanometer. Pada waktu disintesa, perforin tidak akan merusak membran intraseluler karena belum aktif. Di dalam granula sitotoksik perforin terikat dengan serglycin (matriks proteoglikan) dan calreticulin (inhibitor perforin), setelah proses eksositosis, perforin akan terdisosiasi dari polimerisasi serglycin dan calreticulin dan terpolimerasi yang akan masuk ke dalam membran plasma sel target.³⁶

2.2.2.6 Granzyme

Granzyme merupakan molekul yang termasuk dalam famili serin protease, yang diekspresikan secara eksklusif oleh CTL dan sel-NK yang merupakan komponen sistem immune terhadap virus dan transformasi sel pada organisme tingkat tinggi. Granzyme ini terdiri dari granzyme B, granzyme A,C,D,E,F,G,H, dan M. Granzyme B merupakan pro-apoptosis yang paling kuat dibandingkan dengan anggota granzyme-granzyme yang lain. Granzyme telah diteliti dengan baik hanya pada manusia dan tikus. Pada tikus dan manusia, granzyme B teridentifikasi mempunyai level lebih dari 70% dari level keseluruhan granzym-granzym lain.^{37,38}

Granzyme merupakan 90% total massa granula sitolitik, khususnya *secretory lysosome* dari CTL dan sel NK. Secara struktur kimiawi sangat dekat dengan *chymotrypsin*, dengan tiga residu kunci pada *catalytic site*-nya yaitu histidin, asam aspartat, dan serin. Pada tikus diidentifikasi 8 macam granzym yaitu granzyme A-G dan M, sedangkan pada manusia diidentifikasi granzyme B, A, H, M dan granzyme-3 atau tryptase-2.^{37,38}

Pada gambar-6 menunjukkan struktur dari granzyme B. Gambar (a) menunjukkan 2 buah molekul kompleks granzyme (C46-C244,D244-D46) dengan sebuah dimer inhibitor *ecotin* (B6-B142,A142-A6). *Catalytic site* granzyme B terdapat pada daerah pertengahan (C46-C244,D244-D46). Pada (b) terlihat tempat-tempat *catalytic site* (Gln217,Ser221,Arg226,Ser195).^{37,38}



Gambar-6. Struktur kristal kimia dari granzyme B.³⁸
 (Dimodifikasi dari : Trapani JA. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biology* 2001)

Granzyme dapat digolongkan menjadi tiga subfamili menurut spesifitas substratnya yaitu:

1. Golongan granzyme yang mempunyai aktifitas enzimatik menyerupai serin protease chymotrypsin dan secara genetik di *encoding* pada lokus *chymase*.
2. Golongan granzyme dengan aktifitas spesifik *trypsin-like* dan secara genetik di *encoding* pada lokus *tryptase*.
3. Subfamili granzyme yang memecah residu hidropobik, terutama methionin. Secara genetik di *encoding* pada lokus *Met-ase*.

Seluruh granzyme disintesa sebagai zymogen, dan setelah berikatan dengan peptida utama, aktifitas enzimatik maksimal diperoleh dengan lepasnya sebuah dipeptida amino terminal. Seluruh aktivitas granzym ini dapat dihambat oleh inhibitor serin protease, dan inhibitor yang terbaru diidentifikasi adalah *serpin* yang spesifik untuk granzyme. Ekspresi granzyme dapat diukur melalui plasma dengan metoda ELISA, tetapi dapat diukur ekspresinya melalui pengecatan immunohistokimia dengan monoklonal antibodi anti granzyme.^{37,38}

2.2.2.7 *Apoptosis*

Apoptosis adalah suatu kematian sel yang terprogram atau *progammed cell death*. Sekali terjadi aktivasi akan menyebabkan reaksi enzimatik intraseluler. Enzim, 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.³⁷

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 5). 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 perantaraan sekresi perforin.

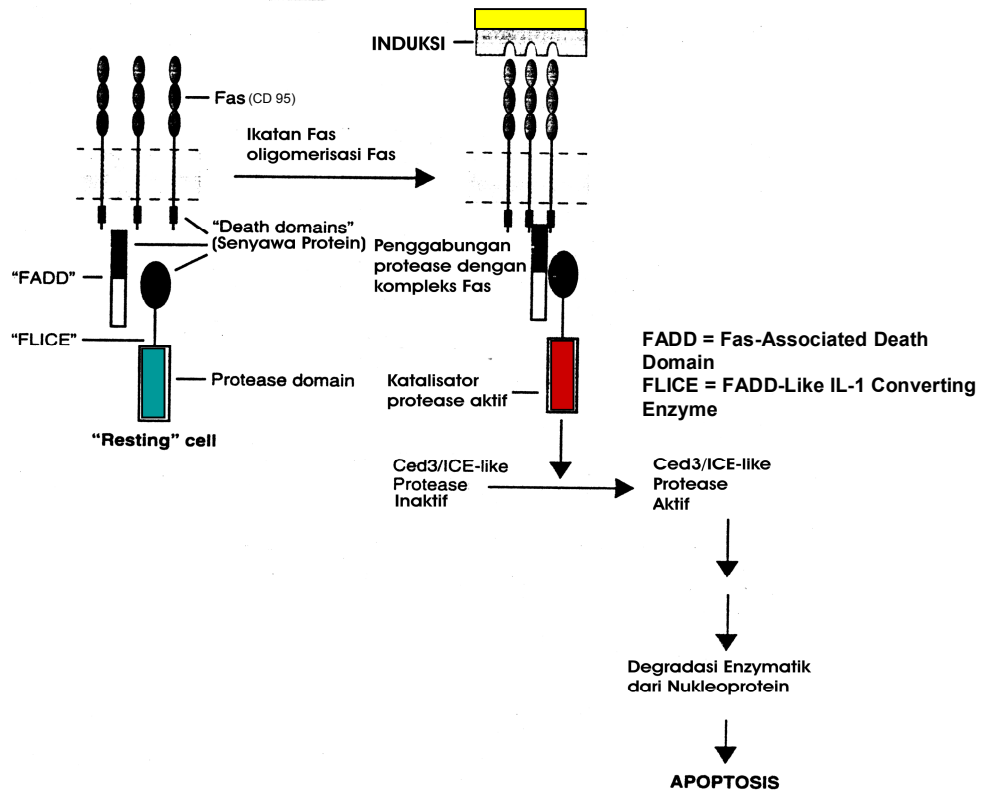
Kerusakan DNA dipicu oleh enzym caspase aktif, di mana caspase ini merupakan suatu molekul protein 10 dan 20 kD berupa protease cystein. Saat ini sudah dikenal \pm 12 jenis caspase. Protein target dari caspase ini adalah protein *DNA repair system* [seperti (ADP-ribose)-polymerase], protein struktural/sitoskeletal (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.^{36,37}

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

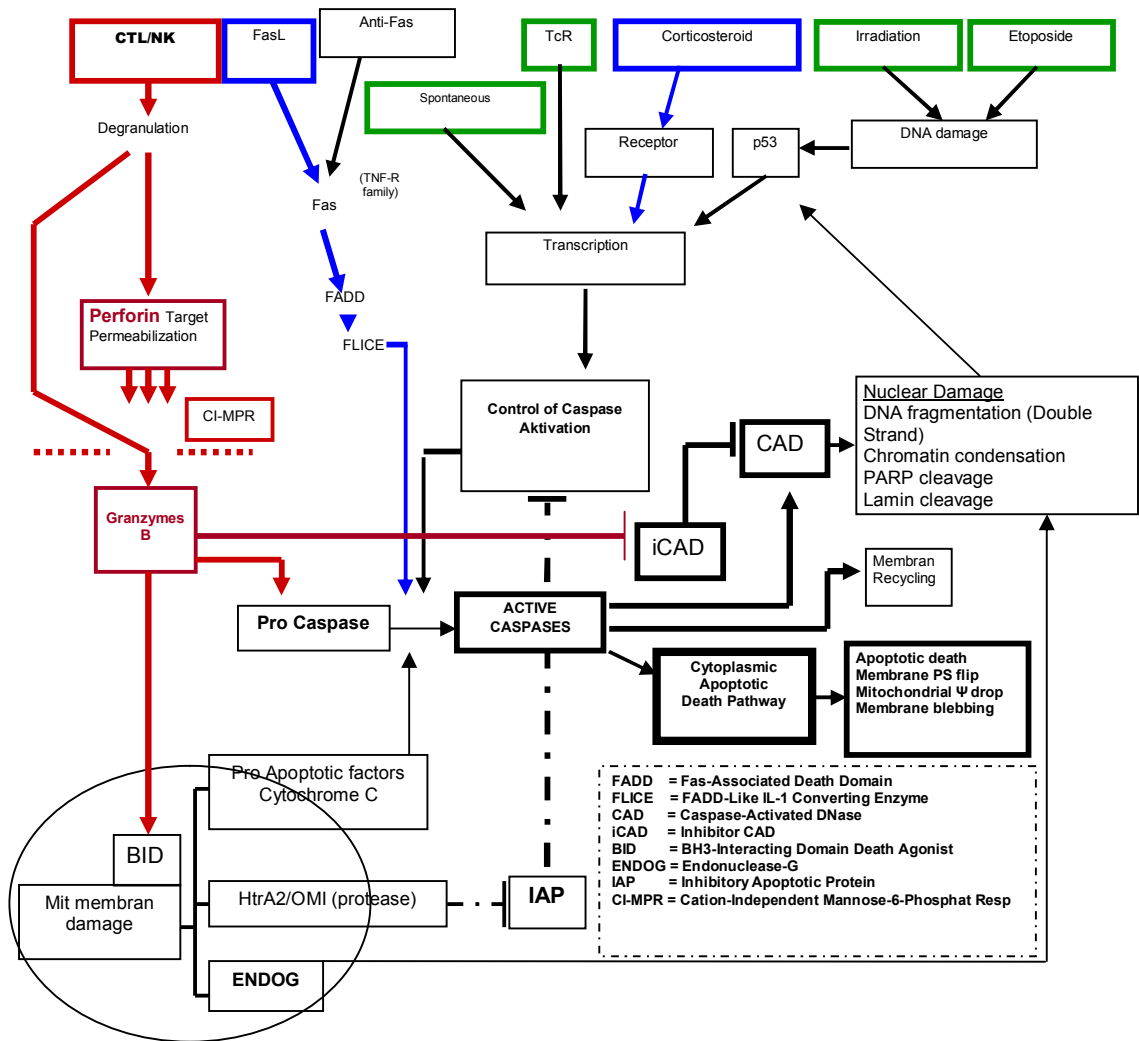
metabolit ligand pada Fas reseptor seperti polyphenol yang terkandung dalam *tanaman obat* (gambar 7).^{13,36,37}

Aktifasi *secretory induce* caspase dilakukan oleh CTL dan sel-NK oleh granula sitotoksiknya yang berisi protein ***pore-forming perforin (cytolysin)*** dan enzim famili dari serine protease yang bernama granzyme sebagai senjata dari CTL/sel-NK. Granzyme ini terdiri dari granzyme B (gambar-8), granzyme A (gambar-9), C,D,E,F,G,H,K, dan M.

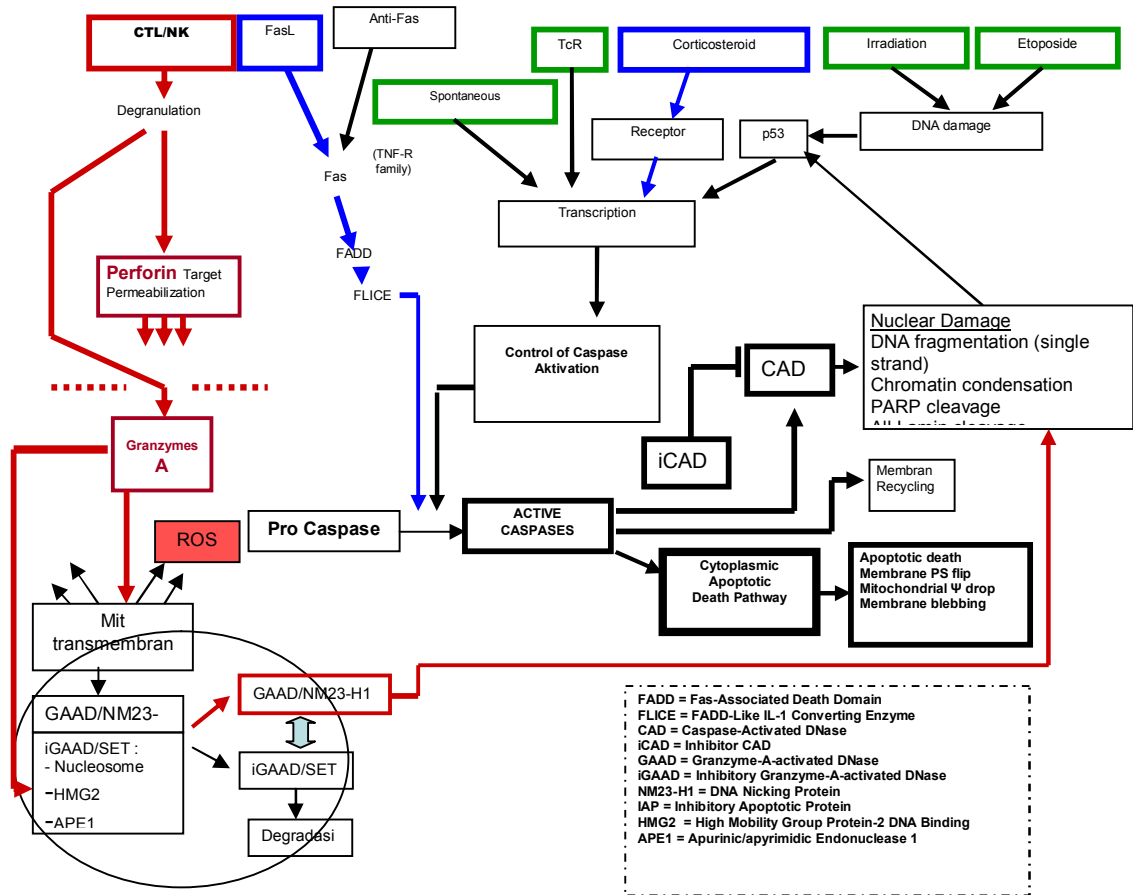
Secara mikroskopik apoptosis dapat diketahui dengan pengecatan HE, dengan melihat *apoptotic body* yang ada. *Apoptotic body* secara mikroskopik dengan pengecatan HE akan tampak sebagai sel tunggal bulat dengan gambaran kromatin yang terkondensasi berwarna basofilik, kadang gambaran kromatinnya terlihat pecah-pecah, dengan sitoplasma yang eosinofilik. Sering terlihat apoptotic body terpisah dari sel-sel sekitarnya yang intak dengan gambaran halo yang jelas.^{36,37}



Gambar-7. Jalur Apoptosis Sel Target yang dipengaruhi oleh reseptor CD95/Fas¹⁵
 (Dimodifikasi dari : Ladish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky S, Lawrence, Matsudaira P, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. 3rd ed. New York: Scientific American Books; 1996).



Gambar-8. Jalur Apoptosis Sel Target yang diinduksi oleh granzyme B.³⁷
 (Dimodifikasi dari : Lieberman J. The ABCS of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. Nat Rev Immunol 2003)



Gambar-9. Apoptosis Sel Target yang diinduksi oleh granzyme A.³⁷
 (Dimodifikasi dari : Lieberman J. The ABCS of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. Nat Rev Immunol 2003)

2.3 Kanker payudara

2.3.1. Etiologi dan Patogenesis

Etiologi kanker payudara sampai saat ini belum diketahui secara pasti. Penyebab terjadinya kanker payudara bersifat multifaktorial yang terkait satu dengan yang lain. Beberapa faktor yang diperkirakan mempunyai pengaruh besar dalam terjadinya kanker payudara adalah riwayat keluarga (faktor genetik), hormonal dan faktor lain yang bersifat eksogen.³⁹

Proto-onkogen yang berperan pada terjadinya kanker payudara adalah C-erb-B2 (neu) yang merupakan reseptor faktor pertumbuhan, dimana oleh karena

berbagai sebab yang tidak diketahui akan mengalami amplifikasi dimana pita dari suatu kromosom akan mengalami penggandaan. Bila daerah yang tergandakan tersebut merupakan lokasi dari suatu proto-onkogen (misalnya C-erb B2), maka proto-onkogen tersebut akan ikut tergandakan sehingga terjadi ekspresi yang berlebihan. Kanker payudara dapat terjadi bila suatu anti-onkogen yang berfungsi untuk memperbaiki suatu kerusakan DNA, karena suatu mutasi kehilangan fungsinya, maka mutasi gen lain menjadi tak dapat dicegah, termasuk mutasi pada gen-gen penyebab kanker⁴⁰.

Pada kanker payudara anti-onkogen yang berperan adalah BRCA-1 (pada kromosom 17) dan BRCA-2 (pada kromosom 13) (BRCA= *breast cancer*). Juga pada keadaan mutasi homozigot pada gen p53, apoptosis tak dapat terjadi dan mutasi tak dapat dicegah. Dalam hal ini gen p53 dengan peran gandanya berfungsi sebagai anti-onkogen yaitu mencegah replikasi sel dengan cara menahan sel tetap berada pada fase G1 (atau G2) dan memicu apoptosis untuk mengeliminasi sel yang mengandung DNA yang rusak. Hilangnya p53 atau mutasi p53 akan menyebabkan hilangnya kendali *check point* ini, sehingga sel-sel dengan kerusakan DNA lolos masuk ke fase S dengan segala akibatnya. Autoantibodi dari p53 telah ditemukan di dalam serum penderita kanker payudara⁴⁰⁻⁴³.

Berbagai faktor resiko berperan penting pada timbulnya kanker payudara.

1. Faktor Usia

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

2. Faktor mutasi genetik

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

3. Faktor Hormonal

Beberapa faktor yang berhubungan dengan estrogen endogen, seperti usia menarche, menopause, riwayat melahirkan anak pertama dan pemberian terapi pengganti hormon meningkatkan resiko kejadian kanker payudara. Epitel payudara normal memiliki reseptor estrogen dan progesteron. Kedua reseptor ditemukan pada sebagian besar kanker payudara. Berbagai bentuk *growth promoters* (*transforming growth factor-alpha / epithelial growth factor, platelet-derived growth factor*), *fibroblast growth factor* dan *growth inhibitor* disekresi oleh sel kanker payudara manusia. Banyak penelitian menyatakan bahwa *growth promoters* terlibat dalam mekanisme *autokrin* dari tumor. Estrogen dan progestin menyebabkan pertumbuhan dan proliferasi dari sel-sel payudara melalui *growth factor* seperti *transforming growth factor (TGF)-alpha*.

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

4. Faktor Lingkungan dan gaya hidup

Beberapa faktor lingkungan dan gaya hidup seperti : alkoholisme, diet tinggi lemak, perokok, perokok pasif dan riwayat radiasi ionisasi pada dada meningkatkan resiko terkena kanker payudara. Hal tersebut mungkin mempengaruhi onkogen dan gen supresi tumor dari kanker payudara³⁹⁻⁴².

2.3.2 Klasifikasi

WHO membuat klasifikasi kanker payudara berdasarkan gambaran histologisnya baik lesi jinak maupun ganas, termasuk papiloma intraduktus, adenoma, karsinoma *in-situ* (duktus dan lobulus), karsinoma invasif (duktus dan lobulus) dan *Paget's disease of the nipple*. Tumor Phyllodes, baik jinak maupun ganas, dan karsinosarkoma merupakan lesi yang jarang, dan merupakan campuran dari epitel dan jaringan ikat. Jenis lainnya adalah angiosarkoma dan limfoma^{30,31,32}.

a. Kanker Payudara Non Invasif

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

1. Karsinoma intraduktus non invasif

Karsinoma intraduktus adalah karsinoma yang mengenai duktus disertai infiltrasi jaringan stroma sekitar. Terdapat 5 subtipe dari karsinoma intraduktus yang dibagi berdasarkan gambaran arsitektur dan gambaran inti sel, yaitu:

komedokarsinoma, solid, kribriiformis, papiler, dan mikrokapiler.

2. Karsinoma lobular in situ

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

b. Kanker Payudara Invasif

1. Karsinoma duktus invasif

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

Secara histologis, jaringan ikat padat tersebar berbentuk sarang atau beralur-alur. Sel berbentuk bulat sampai poligonal, bentuk inti kecil dengan sedikit gambaran mitosis. Pada tepi tumor, tampak sel kanker mengadakan infiltrasi ke jaringan sekitar seperti sarang, kawat atau seperti kelenjar. Jenis ini disebut juga sebagai *infiltrating ductus carcinoma not otherwise*

spercifierd (NOS), scirrhous carcinoma, infiltrating carcinoma, atau carcinoma simplrx.

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

2. Karsinoma lobular invasif

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

Merupakan karsinoma infiltratif yang tersusun atas sel-sel berukuran kecil dan seragam dengan sedikit pleimorfisme. Karsinoma lobular invasive biasanya memiliki tingkat mitosis rendah.

3. Karsinoma musinosum

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

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

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

4. Karsinoma meduler

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

Sel berukuran besar berbentuk polygonal/lonjong dengan batas sitoplasma tidak jelas. Diferensiasi dari jenis ini buruk, tetapi

memiliki prognosis lebih baik daripada karsinoma duktus infiltratif.

5. Karsinoma papiler invasif

Komponen invasif dari jenis karsinoma ini berbentuk papiler.

6. Karsinoma tubuler

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

7. Karsinoma adenokistik

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

8. Karsinoma apokrin

Karsinoma ini didominasi dengan sel yang memiliki sitoplasma eosinofilik, sehingga menyerupai sel apokrin yang mengalami metaplasia⁴³⁻⁴⁵.

2.3.3. Stadium klinik kanker payudara

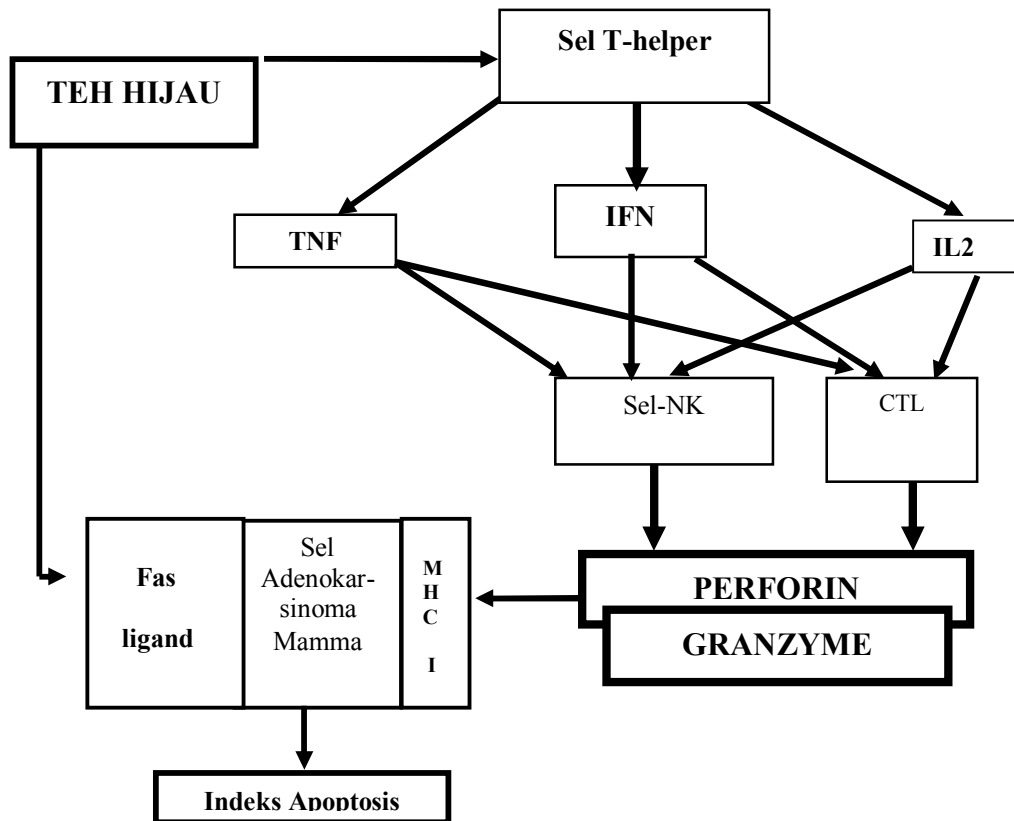
Pengelolaan penderita sangat tergantung pada stadium klinik. Klasifikasi kanker payudara adalah berdasarkan *International Classification of Staging* atau berdasarkan klasifikasi TNM (*Tumour, Node, Metastasis*) *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* atau *International Union Against Cancer (UICC)*

43,44

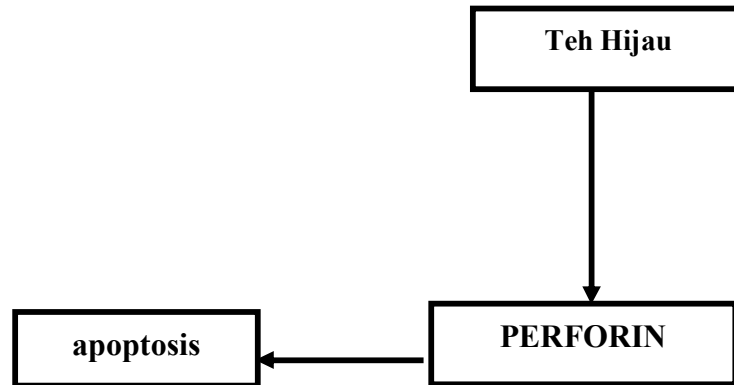
BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka teori



3.2. Kerangka Konsep



3.3 Hipotesis Penelitian

- 3.3.1. Terdapat perbedaan indeks apoptosis dari sel adenocarcinoma mammae mencit C3H antara kelompok yang diberi dan yang tidak diberi Teh Hijau.
- 3.3.2. Terdapat perbedaan ekspresi perforin sel mononuklear (disekitar jaringan adenokarsinoma payudara mencit C3H), antara kelompok yang diberi dan yang tidak diberi Teh Hijau
- 3.3.3. Terdapat korelasi antara indeks apoptosis dengan ekspresi perforin.

BAB 4
METODE PENELITIAN

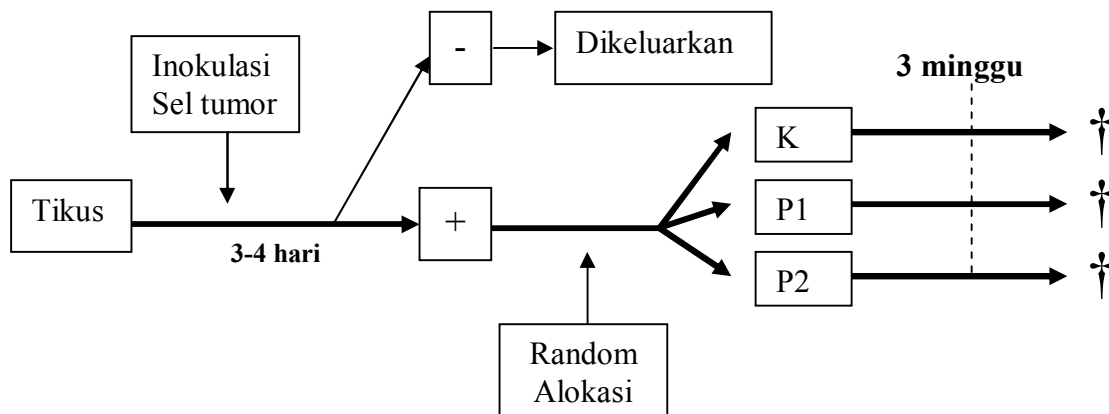
4.1. Rancangan penelitian :

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan disain "*Post test only control group design*". Kelompok penelitian dibagi menjadi 3 yaitu kelompok kontrol (K), Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2) Adapun pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

- K : Kelompok kontrol, mencit yang di inokulasi sel kanker.
- P1 : Kelompok perlakuan 1, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan kemudian mendapat Teh hijau 0,65 cc / hari
- P2 : Kelompok perlakuan 2, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan kemudian mendapat Teh hijau 1,3 cc / hari

Perhitungan penetapan dosis dapat dilihat pada halaman 41.

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



4.2. SAMPEL PENELITIAN

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.

Besar sampel menurut WHO tiap kelompok minimal 5 ekor,⁴⁶ pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok 5 ekor mencit.

Randomisasi: 15 mencit yang sudah berhasil diinokulasi dikelompokkan secara random menjadi 4 kelompok yaitu:

Kelompok K : 5 mencit

Kelompok P1 : 5 mencit

Kelompok P2 : 5 mencit

4.3. WAKTU DAN LOKASI PENELITIAN

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 6 bulan. Perlakuan pada mencit dilakukan di Laboratorium Histologi FK UNDIP, proses pengambilan jaringan dilakukan di Laboratorium Bioteknologi FK UNDIP, proses pembuatan blok parafin, pewarnaan HE dan pewarnaan imunoperoksidase dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FK Universitas Gajahmada/ RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta.

4.4.VARIABEL PENELITIAN

4.4.1. Variabel bebas

Sebagai variabel bebas adalah pemberian teh hijau

4.4.2. Variabel tergantung

Sebagai variabel tergantung adalah :

4.4.2.1. Skor Ekspresi Perforin dengan pewarnaan *antibody monoclonal* anti-perforin pada seluruh jaringan tumor adenokarsinoma,

4.4.2.2. Indeks apoptosis sel kanker payudara yang dihitung sesuai metode yang digunakan oleh *Aihara M et al.*⁴⁸

4.4.3. Definisi operasional

1. Pemberian teh hijau :

Teh hijau yang diberikan adalah Green tea merek Lipton, 1 sachet green tea merek Lipton 1,3gr diencerkan dalam 200cc air 100°C selama 3 menit. Dosis yang digunakan adalah konversi dari dosis manusia 500 ml/hari dikalikan konstanta uji terapi pada hewan coba (mencit) yaitu 0,0026³⁹, sehingga didapatkan $500 \times 0,0026 = 1,3 \text{cc/hari}$, diberikan dalam 1 x 0,65 cc/hari dan 2 x 0,65cc/hari.

2. Ekspresi perforin dihitung jumlah sel limfosit disekitar sel kanker yang memproduksi perforin (berwarna kecoklatan) dengan pewarnaan *antibody monoclonal anti-perforin*, dilihat dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Penghitungan dilakukan di daerah yang bukan sentral nekrosis, dan dicari pada tepi tumor yang kontak dengan vaskularisasi, pada 5 lapangan pandang

besar, diambil rata-rata persentasenya. Dilihat berurutan dari kiri ke kanan. Pengukuran dilakukan oleh 2 orang yaitu peneliti dan ahli Patologi Anatomi, dengan *Agreement* 95 %.

Skala variabel : rasio

3. Indeks apoptosis dihitung dari sediaan tumor dengan pewarnaan HE sesuai dengan metoda yang digunakan oleh Aihara M et al, di mana badan apoptotik dihitung per 100 sel tumor dari area yang signifikan dengan pembesaran 400x, pada 10 lapangan pandang besar dari tiap preparat, dalam satu blok parafin. Kemudian diambil rata-rata hasilnya.

Pengukuran dilakukan oleh 2 orang yaitu peneliti dan ahli Patologi Anatomi, dengan *Agreement* 95 %.

Skala variabel : rasio.

4.5. BAHAN DAN ALAT PENELITIAN

4.5.1 Bahan untuk perlakuan

Hewan coba adalah mencit betina strain C3H dengan umur 3 bulan, dan berat 20 - 30 gram. Adenokarsinoma diperoleh dari mencit donor. Sel adenokarsinoma dari mencit donor ditransplantasikan ke mencit resipien. Sebelum ditransplantasikan, tumor dari mencit donor akan diincisi biopsi dan dilakukan pemeriksaan histopatologi.

4.5.2. Bahan transplantasi jaringan tumor pada mencit

- a. Alkohol 70 %
- b. Larutan Garam fisiologik
- c. Es batu
- d. Mencit donor bertumor
- e. Mencit resipien

4.5.3. Bahan untuk pemeriksaan histopatologi rutin

- a. Formalin buffer 10%
- b. Alkohol 50%, 70%, 80%, 96%, absolute
- c. Xylol
- d. Parafin cair (Histoplast)
- e. Albumin dan Poly-L-Lysine
- f. Bahan pengecatan Hematoksilin-Eosin (HE)
- g. Canada balsam dan Entelan

4.5.4. Bahan tambahan untuk pewarnaan imunoperoksidase

- a. Antibodi primer: *Mouse Monoclonal Antibody (MoAb) anti-perforin (Kamiya Biomedical Science cat.no. MC-030)*
- b. *Kit Universal Streptavidin-Biotin(Labvision^R)*

4.5.5. Alat transplantasi jaringan tumor pada mencit:

1. Cawan petri ukuran 6 Cm
2. Cawan petri ukuran 15 Cm
3. Cawan ukuran 10 Cm
4. Sduit 1cc

5. Jarum suntik trocar
6. Gunting lurus 10 Cm
7. Gunting bengkok 10 Cm
8. Pinset anatomi 10 Cm
9. Pinset biasa 12 Cm
10. Alas fiksasi

4.5.6. Alat untuk pembuatan sediaan penelitian dengan pewarnaan H&E:

- a. Inkubator suhu 56⁰C
- b. Mikrotom
- c. Kaca obyek dan kaca penutup

4.5.7. Alat tambahan untuk pewarnaan imunoperoksidase

- a. Pensil PAP
- b. *Waterbath*
- c. Tempat pewarnaan dan pencucian
- d. *Timer*
- e. Pipet serologic
- f. Kertas saring
- g. *Freezer*
- h. Tabung plastic dan pipet *Ependorf*
- i. *Epismikrometer sekuler*

4.5.8. Alat untuk dokumentasi sediaan adalah fotomikrograf dan kotak sediaan.

4.6. PROSEDUR PEMERIKSAAN

4.6.1. Prosedur transplantasi tumor

- a. Mencit donor dimatikan dengan eter, kemudian diletakkan terlentang pada tatakan / alas fiksasi dan keempat kakinya difiksasi dengan jarum.
- b. Kulit dibagian yang bertumor diusap dengan alkohol 70 %, kemudian dibuat sayatan dengan gunting lurus, untuk mengeluarkan tumor.
- c. Diambil sebagian tumor yang padat, dimasukkan ke dalam botol formalin untuk dibuat sediaan mikroskopik.
- d. Sisa tumor diletakkan di cawan petri kecil yang telah terlebih dahulu dicuci dengan garam fisiologis dan diletakkan diatas es.
- e. 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.
- f. Bubur tumor disuntikkan subkutan di aksila kanan mencit dengan dosis 0,2 ml.

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

4.6.2. Prosedur pembuatan preparat histopatologi

a. Fiksasi

Potongan adenokarsinoma dimasukkan dalam larutan formalin buffer (larutan formalin 10% dalam buffer Natrium asetat sampai mencapai pH 7,0).

Waktu fiksasi jaringan 18-24 jam. Setelah fiksasi selesai, jaringan dimasukkan dalam larutan aquadest selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi.

b. Dehidrasi

Potongan adenokarsinoma dimasukkan dalam alkohol konsentrasi bertingkat. Jaringan kemudian dimasukkan dalam larutan alkohol-xylool selama 1 jam dan kemudian larutan xylool 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%)–alkohol – asam asetat | 1 menit | | |

f. Pewarnaan imunoperoksidase dengan *Streptavidin-Biotin*

Supaya dapat dilakukan pewarnaan dengan antibodi, jaringan harus terbebas dari paraffin. Deparafinisasai mengikuti urutan seperti tersebut pada lampiran Setelah diberi substrat kromogen, perforin yang terdapat dalam sitoplasma sel CTL dan sel NK akan berwarna merah kecoklatan.

Prosedur pewarnaan *Mo Ab Anti perforin*

(Lab.Patologi Anatomi FK UGM / RSUP Dr.Sardjito Yogyakarta)

Xylol I.....5-10 menit

Xylol II.....5-10 menit

Alkohol absolut10 menit

Alkohol 95%5-10 menit

Alkohol 70%5-10 menit

Cuci air (celup-celup)1-2 menit

Cuci dengan Phosphat buffer saline (PBS) celup-celup1-2 menit

Sekitar jaringan dibersihkan dengan lap

Slide dimasukkan kedalam tempat yang lembab dan tertutup

H₂O₂ 0,3% dalam methanol 10 menit

Masuk rak berdiri

Cuci PBS 3 kali @ 1-2 menit

Slide ditata dalam wadah gelas

Rendam dengan Citrat Buffer

Masukkan dalam microwave 2 kali @ 5 menit (jangan sampai mendidih)

Keluar dari microwave didiamkan sampai dingin selama 20 menit.

Slide ditata dirak

Cuci PBS (celup-celup)2 menit

Slide ditata didalam tempat yang lembab dan tertutup.

Blocking Agent (Kit)10 menit

Bloking agent dibuang (tanpa dicuci)

Inkubasi MoAb primer 10 ul (diencerkan pakai PBS-BSA)...overnight

Simpan dalam tempat lembaba tertutup dan simpan dalam lemari es bawah
supaya tidak mongering

Cuci PBS (celup-celup) 10 menit

CuciPBS2-3 menit

Streptavidin10 menit

Cuci PBS2-3 menit

DAB8 menit

DAB dibuang

Slide ditata pada rak

Cuci air mengalir kemudian dicelup di tempat berisi Aquadest (jaringan terlihat coklat), Slide ditata dalam tempat

Counterstain dengan Hematoksin4 menit

Hematoksin dibuang, cuci air mengalir kemudian dicelup di aquadest

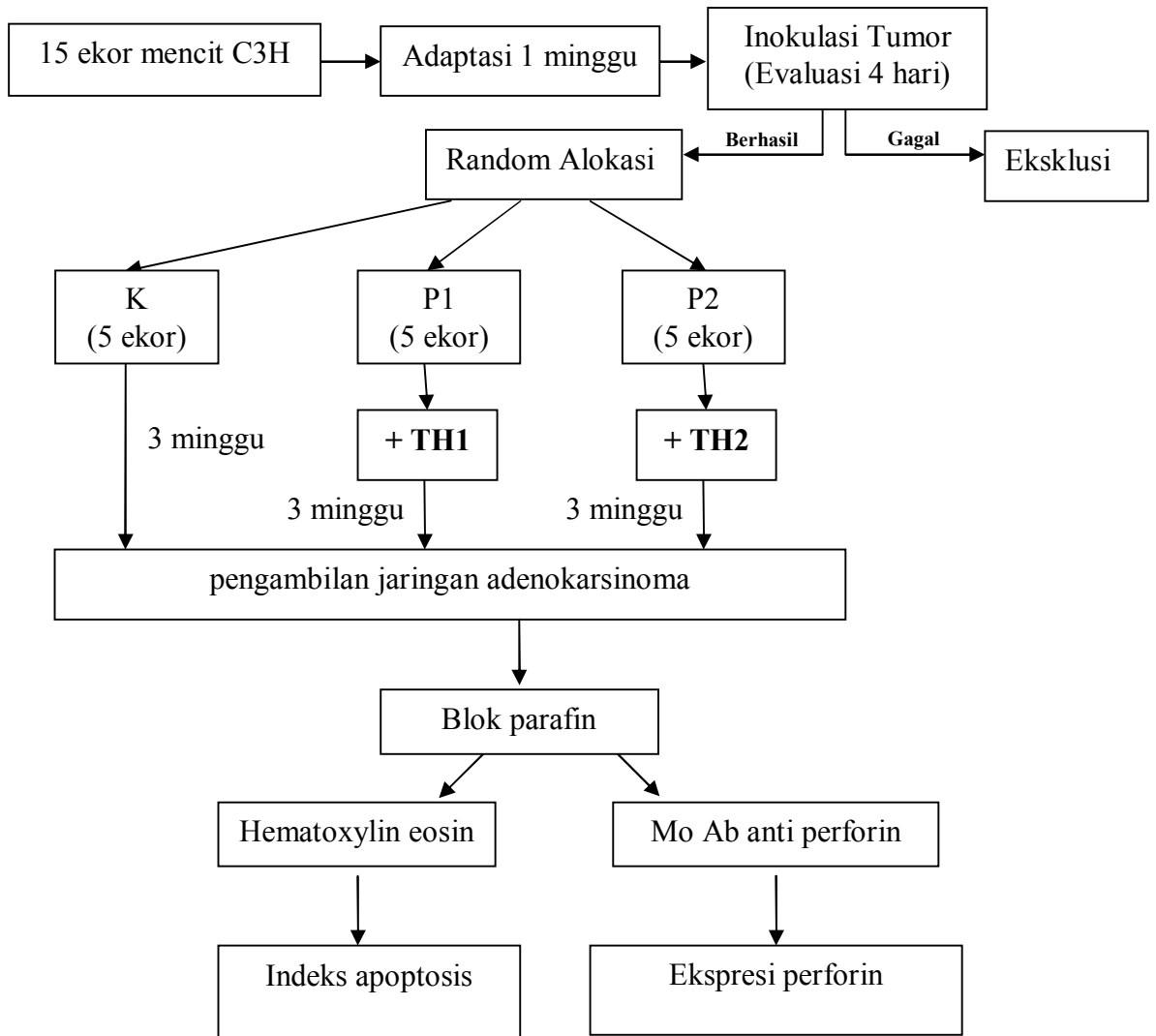
Entellan kemudian tutup deck glass.⁴⁹

4.7. PELAKSANAAN PENELITIAN

4.7.1. Cara perlakuan

Lima belas ekor mencit betina strain C3H diadaptasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransum pakan standard selama 1 minggu secara ad libitum. Dilakukan inokulasi tumor, evaluasi 4 hari, yang berhasil dilakukan random alokasi dibagi menjadi 3 kelompok masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit. Masing-masing kelompok dikandangkan secara individual dan mendapatkan pakan standard yang sama dan minum ad libitum. Perlakuan yang diberikan adalah seperti pada halaman 39, pemberian teh hijau dengan pipet mikro. Setelah selesai perlakuan, mencit di anaestesi dengan ether selanjutnya mencit dibunuh dengan dislokasi vertebra cervical, kemudian diambil jaringan tumornya. Jaringan tumor diproses menjadi preparat histologik setelah dibuat dengan blok paraffin.

4.8. ALUR KERJA



TH1=Teh hijau dosis 0,65 mL/hari
TH2=Teh hijau dosis 1,3 mL/hari

4.9. CARA PENGUMPULAN DATA

Dari masing-masing kelompok dibuat preparat setebal 6 mikron, diwarnai dengan pengecatan HE kemudian dihitung indeks apoptosisnya yaitu jumlah badan apoptotik pada tiap 100 sel kanker. Tiap kelompok juga dibuat preparat untuk mengetahui ekspresi Perforin dengan pewarnaan *mouse monoclonal antibody anti-perforin*, kemudian dihitung jumlah sel limfosit disekitar sel kanker yang memproduksi perforin

4.10. ANALISIS DATA

4.10. ANALISIS DATA

Setelah data terkumpul dilakukan *data cleaning*, *coding* dan tabulasi. Analisa data meliputi analisis deskriptif dan uji hypothesis. Pada analisa deskriptif ekspresi perforin dan skor derajat histologi adenokarsinoma mamma disajikan dalam bentuk tabel rerata

Analisis statistik dalam penelitian ini menggunakan uji *One way ANOVA* . Dilakukan uji normalitas data masing-masing kelompok dilakukan dengan menggunakan uji *Shapiro Wilk* . Uji homogenitas data tidak dilakukan karena pada ketiga kelompok didapatkan galur yang sama, betina, umur, berat, dan perlakuan yang sama kecuali dalam hal pemberian teh hijau, sehingga tiap kelompok perlakuan homogen. Post hoc test untuk variabel-variabel tersebut adalah dengan menggunakan uji Bonferoni

Uji korelasi antara variabel ekspresi perforin dengan Indeks Apoptosis dilakukan dengan uji korelasi bivariat *Pearson*.

BAB 5

HASIL

Pada penelitian ini sampel meliputi 15 ekor mencit betina strain C3H yang berusia 3 bulan dengan berat badan 20-30 gram setelah adaptasi 1 minggu kemudian diinokulasi tumor. Semuanya berhasil, dan tidak ada mencit yang sakit, dilakukan random alokasi dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan:

5 ekor mencit kelompok kontrol

5 ekor mencit kelompok perlakuan 1

5 ekor mencit kelompok perlakuan 2

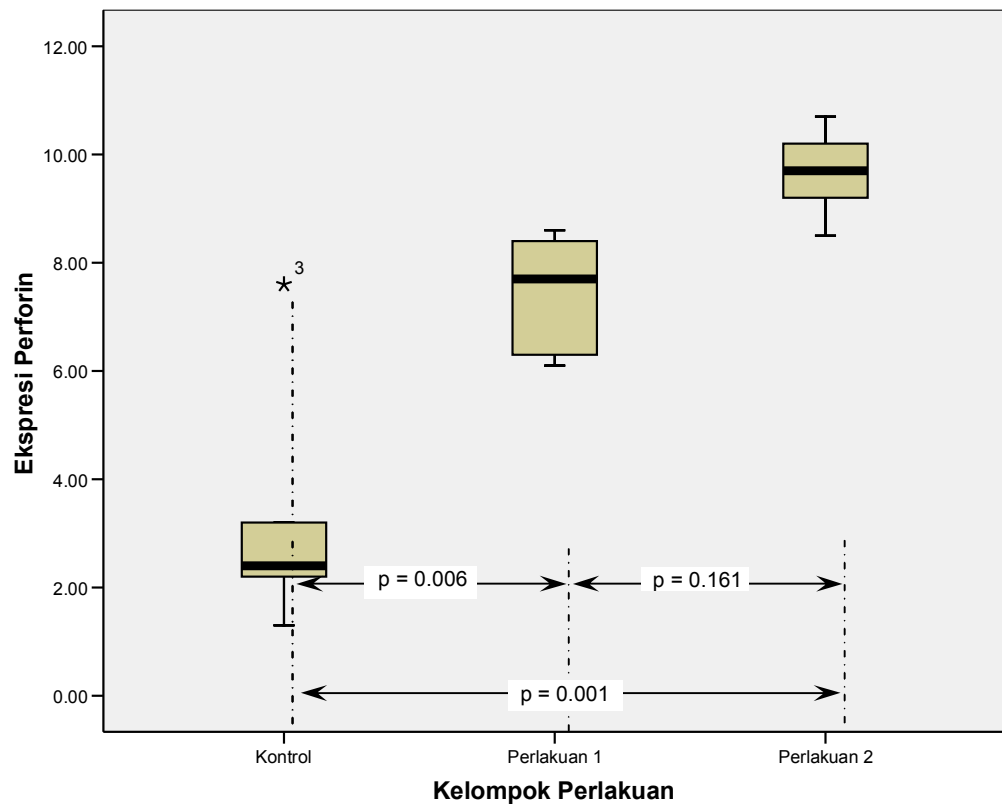
Tidak ada sampel yang drop out atau mati sehingga semua ikut dalam penelitian ini. Sediaan sel tumor dilakukan pemeriksaan skor ekspresi perforin dan indeks apoptosis dengan *Agreement* 95 %.

Berdasarkan uji normalitas dari skor perforin dan indeks apoptosis masing-masing kelompok dengan menggunakan uji Shapiro-Wilk didapatkan bahwa distribusi data tiap kelompok perlakuan adalah normal. $p > 0,05$

Penelitian ini ketiga kelompok didapatkan galur yang sama, jenis kelamin, umur, berat, dan perlakuan yang sama kecuali dalam hal pemberian teh hijau, sehingga ketiga kelompok homogen.

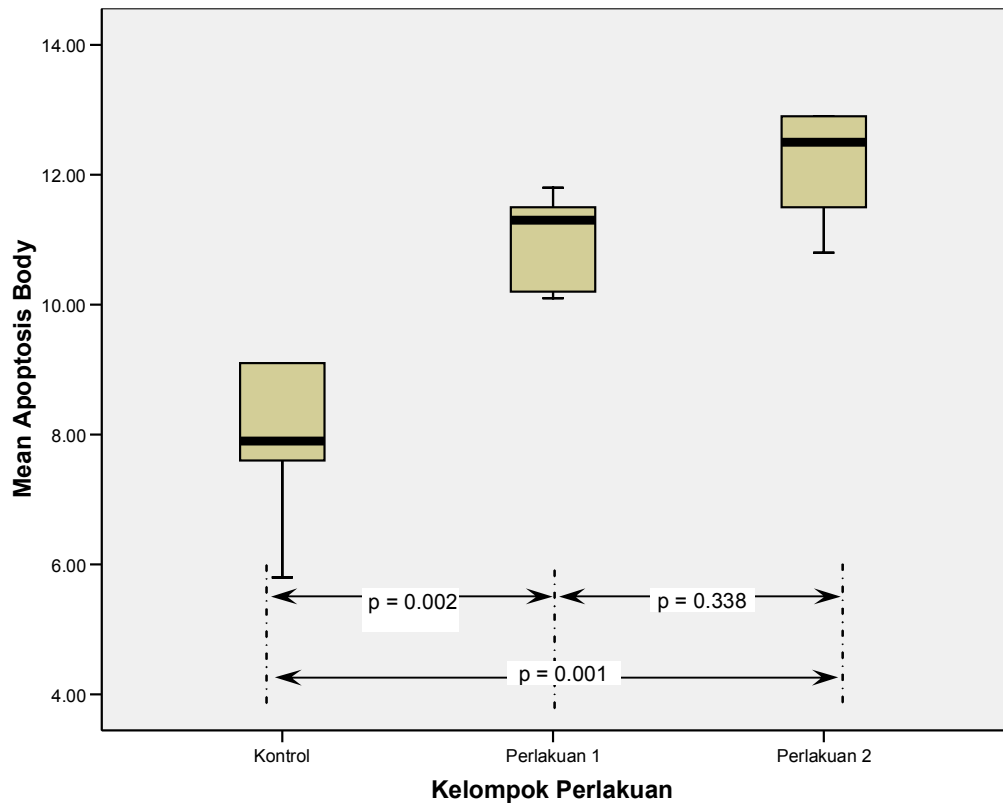
Hasil uji *ANOVA* didapatkan bahwa keseluruhan kelompok dari variabel indeks apoptosis mempunyai perbedaan yang bermakna ($p = 0,001$). Variabel skor perforin juga menunjukkan perbedaan yang bermakna secara statistik ($p = 0,001$).

Hasil pengukuran ekspresi perforin dan indeks apoptosis dapat dilihat pada gambar 10 dan 11.



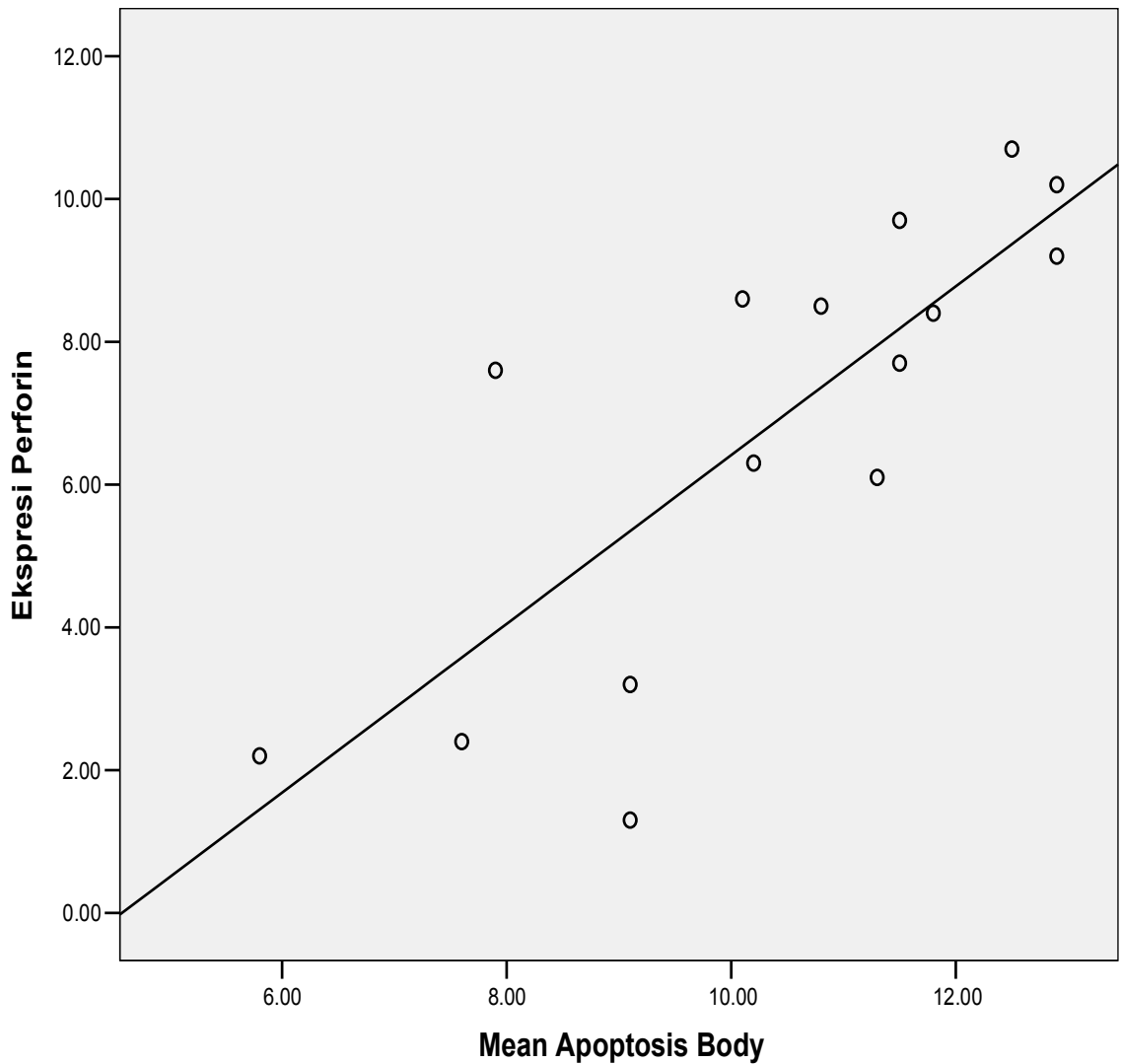
Gambar-10 . Boxplot hasil penghitungan *ekspresi perforin* pada kelompok kontrol, dosis 0,65 cc (P1), dan dosis 1,3 cc (P2). (Anova $p=0,001$)

Uji Bonferoni pada variabel skor perforin menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,006$) antara kelompok kontrol (K) dan perlakuan 1 (P1), dan terdapat perbedaan yang bermakna juga ($p=0,001$) antara kelompok kontrol (K) dan perlakuan 2 (P2). Sedangkan antara kelompok perlakuan 1 (P1) dengan kelompok perlakuan 2 (P2) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,161$).



Gambar-11. Boxplot hasil penghitungan *indeks apoptosis* pada kelompok kontrol, dosis 0,65cc (P1), dan dosis 1,3cc (P2). (Anova $p=0,001$)

Uji Bonferoni pada variabel indeks apoptosis menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,002$) antara kelompok kontrol (K) dan perlakuan 1 (P1), dan terdapat perbedaan yang bermakna juga ($p=0,001$) antara kelompok kontrol (K) dan perlakuan 2 (P2). Sedangkan antara kelompok perlakuan 1 (P1) dengan kelompok perlakuan 2 (P2) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,338$).



Gambar 12. Grafik korelasi antara ekspresi perforin dengan indeks apoptosis (p=0,001)

Uji korelasi Pearson untuk mencari hubungan antara peningkatan skor perforin dengan peningkatan indeks apoptosis, didapatkan hasil 0.793 ($p < 0.001$) yang berarti terdapat korelasi yang positif kuat antara peningkatan skor perforin dengan peningkatan indeks apoptosis.

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk melihat pengaruh pemberian teh hijau terhadap adenokarsinoma mamma mencit C3H. Penelitian ini dinilai berjalan baik mengingat semua perlakuan bisa dinilai semua (tidak ada yang drop out), dan tidak ada *disagreement* antara peneliti dan ahli patologi (sebagai gold standar) untuk melihat skor perforin dan indeks apoptosis.

Hasil uji statistik One Way ANOVA, didapatkan bahwa ternyata kenaikan ekspresi perforin dan kenaikan indeks apoptosis dipengaruhi oleh peningkatan dosis pemberian ekstrak Teh Hijau ($p = 0,001$), dan peningkatan ini cukup bermakna untuk kedua variabel tersebut yaitu peningkatan ekspresi perforin ($p = 0,001$), dan peningkatan indeks apoptosis ($p = 0,001$). Hasil pengujian dengan *Post Hoc test* ekspresi perforin didapatkan adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok percobaan. Pada kelompok perlakuan 1 dengan pemberian dosis Teh Hijau sebesar 0,65 cc/hari terjadi peningkatan ekspresi perforin yang bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada pemberian dengan dosis 1,3 cc/hari juga terjadi peningkatan yang bermakna dibandingkan kontrol. Namun, peningkatan ekspresi perforin pada kelompok yang mendapat dosis 1,3 cc/hari tidak berbeda dengan kelompok yang mendapat dosis 0,65 cc/hari.

Indeks apoptosis dalam penelitian ini didapatkan adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok kontrol dan percobaan ($p = 0,001$). Kelompok perlakuan 1 dengan pemberian dosis Teh Hijau sebesar 0,65 cc/hari terjadi

peningkatan ekspresi perforin yang bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p = 0,001$), pada pemberian dengan dosis 1,3 cc/hari juga terjadi peningkatan yang bermakna dibandingkan kontrol ($p = 0,001$). Namun tidak ada perbedaan indeks apoptosis pada kedua kelompok dosis.

Pada penelitian ini ternyata teh hijau dapat memacu peningkatan ekspresi perforin dan apoptosis. Didapatkan peningkatan ekspresi perforin dan apoptosis pada kedua kelompok dosis, tetapi secara statistik tidak bermakna. Hal ini disebabkan jumlah sampel penelitian yang kecil. Hasil penelitian ini ternyata sesuai penelitian Zhao dan Tian di Cina yang menyatakan bahwa Epigallocatechin gallate merupakan unsur utama teh dalam memacu apoptosis pada Ca mamma²¹ dan penelitian yang dilakukan di Cleveland University oleh Nihal dan Gupta diketahui bahwa Polyphenol dalam teh hijau dapat menginduksi terjadinya apoptosis melalui jalur TNF- α .⁴⁹

Uji korelasi *Pearson* didapatkan bahwa peningkatan ekspresi perforin mempunyai korelasi yang bermakna ($p = 0,001$) terhadap kenaikan indeks apoptosis, dengan koefisien korelasi 0,793 sehingga bila ekspresi perforinnya meningkat maka indeks apoptosisnya akan meningkat pula. Hubungan ini terjadi karena bila CTL dan Sel-NK telah teraktivasi dan melepaskan perforin, dinding membran sel tumor akan rusak. Setelah dinding sel rusak, CTL maupun sel-NK akan melepaskan granzym yang akan menginduksi terjadinya apoptosis.³⁶⁻³⁸ Penelitian ini korelasinya tidak 1, berarti ada jalur lain sebagai penyebab apoptosis selain melalui jalur perforin. Hal ini dapat dijelaskan dengan adanya ikatan ligand dan Fas maka sel tumor akan mengalami apoptosis.^{36,37}

Ekspresi perforin oleh CTL dan sel-NK dapat dikarenakan adanya zat-zat yang terkandung dalam ekstrak teh hijau seperti catechin polyphenol, yang bisa dijadikan bahan penelitian lebih lanjut. Polyphenol dalam ekstrak teh hijau sendiri, metabolitnya akan berperan sebagai ligand pada reseptor Fas sel-sel tumor, dengan terikatnya ligand pada reseptor Fas maka sel-sel tumor akan mengalami proses apoptosis, pada proses tersebut sel tumor akan mengekspresikan protein asing di permukaan sel tumor, sehingga sel-sel tumor tersebut akan dikenali oleh *Antigen Presenting Cell*, salah satunya makrofag. Setelah mengenali *non self* antigen ini, makrofag akan mengeluarkan mediator-mediator sitokin, seperti IL-2, IFN- γ . Interleukin-2 yang diekspresikan makrofag akan mengaktifasi sel-sel T-helper CD4. Sel-sel T-helper CD4 yang teraktivasi akan menghasilkan IL-2 yang secara autokrin maupun parakrin akan mengaktifasi sel-sel T-helper CD4 lain, dengan demikian lebih banyak sel-sel T-helper CD4 yang aktif, yang akan mengekspresikan sitokin IFN- γ dan TNF- α . IFN- γ dan TNF- α ini akan mengaktifasi CTL dan sel-NK untuk melakukan *killing* terhadap sel-sel tumor yang dijumpai.^{13,34} Penelitian lebih lanjut atas ekstraksi zat aktif dalam teh hijau perlu dilakukan.

BAB 7

SIMPULAN DAN SARAN

7.1. Simpulan

Pemberian teh hijau terhadap adenokarsinoma mamma mencit C3H didapatkan peningkatan bermakna skor perforin dan indeks apoptosis dibandingkan kontrol, tetapi tidak didapatkan peningkatan bermakna secara statistik antara perlakuan 1 dan perlakuan 2, dan didapatkan hubungan yang positif kuat antara peningkatan skor perforin dan indeks apoptosis pada mencit C3H.

7.2. Saran

Untuk menyempurnakan konsep pemikiran pada penelitian ini masih perlu dilakukan penelitian dengan sampel yang lebih besar dan juga penelitian lanjutan zat-zat yang terkandung dalam ekstrak teh hijau yang berperan sebagai ligand pada reseptor Fas sel-sel tumor, dengan terikatnya ligand pada reseptor Fas maka sel-sel tumor akan mengalami proses apoptosis.

Keterbatasan lain penelitian ini mengingat Lipton bukan merk dagang komoditas farmasi, maka perlu adanya standarisasi bahan teh hijau untuk kemungkinannya dilakukan pengujian klinis lanjutan pada manusia. Hal ini diperlukan mengingat banyaknya produk teh hijau yang beredar di pasaran.

DAFTAR PUSTAKA

1. Deteksi dini kanker payudara. Republika online; Available from : URL:
http://www.republika.co.id/cetak_berita.asp. Diakses tanggal 2 April 2006
2. Sugito H. Kanker di Indonesia Tahun 1994 Data Histopatologik. Badan Registrasi Kanker Ikatan Ahli Patologi Indonesia. Dirjen YanMed Dep. Kes RI ; 1994 : 3-6.
3. Profil Kesehatan Provinsi Jawa Tengah Tahun 2005. Pencapaian Program Kesehatan Menuju Jawa Tengah Sehat. Dinas kesehatan Pemerintah provinsi jawa tengah ; 2005. Available from : URL
<http://www.dinkesjateng.org/profil2005/bab4.htm> Diakses tanggal 2 April 2006
4. Sarjadi, Trihartini. Cancer registration in Indonesia. Asian Pasific J Cancer 2001;2:21-4
5. Beretta G. Cancer treatment medical guide. 10th ed. Milan: Farmitalia Carlo Erba-Erbamont; 1991. p. 174-6.
6. Wuyung PE, Kusmardi, Pringgoutomo S. Daya hambat β -karoten pada minyak kelapa sawit terhadap pertumbuhan in vitro sel tumor kelenjar susu mencit C3H. Majalah Patologi Indonesia. 1999; 8:12-6.
7. Hirota F. Two Stage of Cancer Prevention with Green Tea. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. Saitama Cancer Centre Research Institute, Ina, Kitaadachi-gun, Saitama Japan. 1999 : 589-97.
8. Hirota F. "Anticarcinogenic Effect of Epigallocatechin Gallate" Preventive Medicine. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. Saitama

- Cancer Centre Research Institute, Ina, Kitaadachi-gun, Saitama Japan. 1992 : 503-9.
9. Cassileth B, Yeung KS. Green Tea. Memorial Sloar-Kettering Cancer Centre; 2003. www.mskcc.org/mskcc/print/11571.cfm Diakses tanggal 2 Mei 2006
 10. Kamath BA. Antigen in Tea-Beverage Prime Human T-cells in Vitro and in Vivo for Memory and Non Memory Antibacterial Cytokine Response. National Jewish Medical and Research Center, Denver. Published Online by PNAS Online. March 2003 Vol.100. no. 10 : 6009-14
 11. Gary W. V, Fajun Y, Eun YL. Green tea polyphenol extract attenuates inflammation in interleukin-2-deficient mice: a model of autoimmunity. *J Nutr* 2001;131:2034-9.
 12. 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. Toledo Glendale avenue: Medical College of Ohio 2002;16(1):36–42.
 13. Abbas A, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. 5th ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders; 2005. p. 4-15,22-3,65-80,81-103,182-7,247-53,258-9,266,268-9,279-80,290-5.
 14. Perhimpunan Ahli Bedah Onkologi Indonesia (PERABOI). Kumpulan Naskah Ilmiah. Mukhtar Nasional VI; Semarang (INA): Peraboi; 2003. p. 22-9.
 15. 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.

16. Wunderlich J R., Restifo N P. Essentials of immunology. In: Vincent TD, Samuel H, Steven AR. editors. Principles & practice of oncology. 5th ed. Philadelphia: Lippincot and Raven; 1997. p. 47-75.
17. Henkart PA. Molecular mechanism of lymphocytes-mediated cytotoxicity: molecular mechanism of T lymphocyte apoptosis. Pierre Henkart laboratory. Available from:
URL:http://rex.nci.nih.gov/research/basic/eib/henkart_2002.htm. Diakses tanggal 2 Mei 2006
18. Kresno SB. Aspek imunologi pada kanker. Nelwan editor. Simposium ke-4 Jakarta Antimicrobial Update 2003. Jakarta: Sub Bagian Penyakit Tropik dan Infeksi Bagian Ilmu penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Rumah Sakit Umum Pusat Nasional Dr Cipto Mangunkusumo; 2003. p. 59 – 77.
19. Roitt IM. Immunology, 8th ed. Barcelona: Times Miror International; 1994. p. 21-8
20. Kawasaki. Perforin, a pore-forming protein detectable by monoclonal antibodies, is a functional marker for killer cells. Int Immunol 1990;2:677-84.
21. Zhao X, Tian H. Epigallocatechin gallate, the main ingredient of tea induces apoptosis in breast cancer cells. Front Biosci; 2006. p. 2428-33
22. Wiratno. Pengaruh Polifenol the hijau terhadap jumlah monosit dan limfosit serta fungsinya dalam memproduksi TNF- α , IFN- γ dan IL-2 pada penderita karsinoma nasofaring yang mendapat radioterapi. Semarang: Universitas Diponegoro 2007. Disertasi.

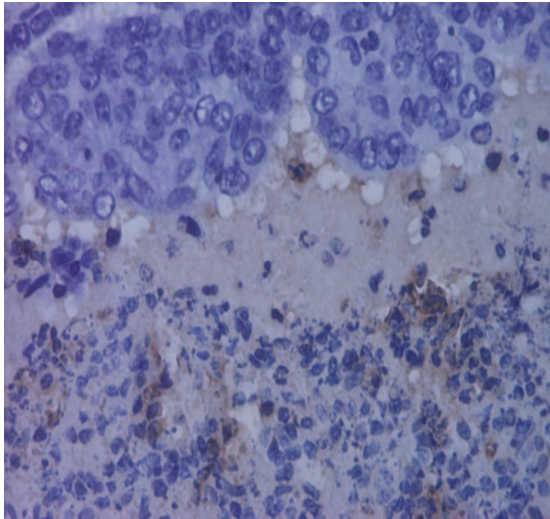
23. Roitt IM. *Essentials Immunology*, 6th ed. Blackwell sci. publ. London, 1988
24. Stites DP, Terr Abba I, Parslow TP, .*Medical Immunology*, 9th ed, Stamford Connecticut, USA: Appleton & Lange, 1997.
25. Constatinides P. *General Pathobiologi*. Connecticut: Appleton & Lange, 1994 : 173 - 90
26. Sarjadi. *Karsinoma epidermoid serviks uteri (Beberapa aspek epidemiologi serta peran histopatologi dan petanda tumor dalam penentuan prognosis)*. Disertasi doktor Universitas Diponegoro. Semarang, 1985
27. Contran RS, Kumar V, Robbins SL. *Robin Pathologic basis of Disease*. 5th ed. Philadelphia : WB Saunders, 1994.
28. Whiteside TL, Haberman RB. Characteristics of natural killer cell and lymphokine-activated killer cells. In: Oettgen H.F editor. *Human cancer immunology*. Philadelphia: WB Saunders Company; 1990. p. 718-44.
29. Lehman C, Zeis M, Schmithz N, Uharek L. Impaired binding of perforin on the surface of tumor cells is a cause of target cell resistance against cytotoxic effector cells. *Blood*. 2000; 96: 594 – 600.
30. Thornthwaite JT. My discovery of the natural killer cell.
<http://www.cancerfoundation.com/NKcells.html>. 2002 Diakses tanggal 2 Mei 2006
31. Shirley IM. Epidemiologi kanker payudara dan pengendaliannya. *Medika* 2000;5:326-9.
32. 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. p. 187-94.

33. Dickson RB, Lippman ME. Cancer of the breast. In: Vincent TD, Samuel H, Steven AR. Editors. Principles & practice of oncology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997. p. 1541-616
34. Greenberg PD. Mechanism of tumour immunologi. In: Stites DP, Terr A I editors. Basic and Clinical Immunologi. 8th ed. USA: Prentice-Hall Int; 1998. p. 569-75
35. Sobin LH, Wittekind CH. Classification of malignant tumours TNM: International Union Against Cancer UICC. 6th ed. New York: A John Wiley & Sons Inc; 2002. p. 131-41.
36. Goodman JW. The immune response. In: Stites DP, Terr A I editors. Basic and Clinical Immunologi. 8th ed. USA: Prentice-Hall Int; 1998. p. 40-9
37. Lieberman J. The ABCS of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003;5(3):361-70.
38. Trapani JA. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biology* 2001;3014.1-7 Available from:
 URL: <http://www.ajp.amjpathol.org/cgi/content/full/153/4/1041?l> Diakses tanggal 2 Mei 2006.
39. Anonim, Breast cancer : Prevention health professional version. Available from : <http://www.cancer.gov>. Diakses tanggal 23 Mei 2007
40. Wunderlich JR, Restifo NP. Essentials of Immunology Cancer : Principles and Practice of Oncology, 5th ed, Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia 1997; 3:47-75

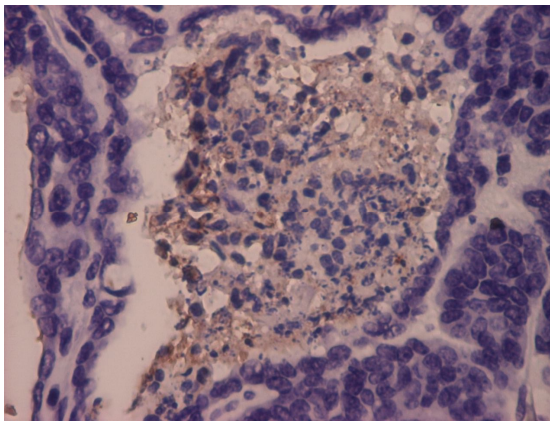
41. Dickson RB, Lippman ME. Cancer of the Breast : Principles and Practice of Oncology, 5th ed, Lippincot-Raven Publishers , Philadelphia 1997; 36:1541-1616
42. Robinson EK., Hunt KK., Noninvasive Breast Cancer, The M.D. Anderson Surgical Oncology Handbook 2nd Ed. Houston, Texas : Lippincott Williams & Wilkins, 1999; 1:1-12
43. Ahearne PM., Leach SD., Feig BW.. Invasive Breast Cancer. The M.D. Anderson Surgical Oncology Handbook 2nd Ed. Houston, Texas : Lippincott Williams & Wilkins, 1999; 2:13-37
44. AJCC Cancer Staging Handbook 6th Ed. Chicago : Springer, 2002
45. 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?> Diakses tanggal 2 Mei 2006
46. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. New York: World Health Organization; 1993. p. 44.
47. 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.
48. Leong ASY. Immunohistochemistry: theoretical and practical aspects. In: Edward A. editor. Applied Immunohistochemistry for the surgical pathologist. London: Prentice Hall International Inc; 1993. p. 234-8.
49. Nihal A, Gupta S. Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate Differentially Modulates Nuclear Factor κ B in Cancer Cells versus Normal

Cells. Department of Dermatology, Case Western Reserve University, 11100
Euclid Avenue, Cleveland, Ohio. 2002. Available from :URL:
<http://www.sciencedirect.com/science?> Diakses tanggal 23 Mei 2007

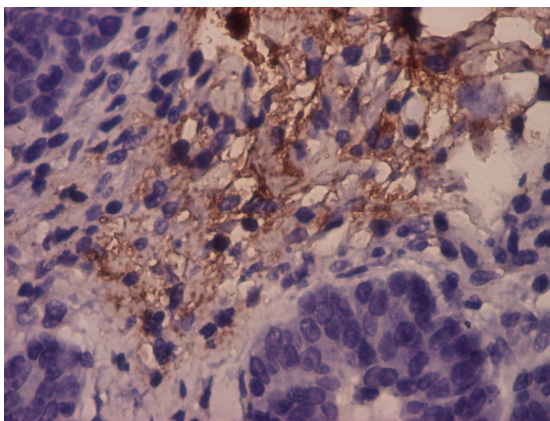
Lampiran 1. Hasil pemeriksaan ekspresi perforin



Perforin Kontrol dengan pembesaran 400X

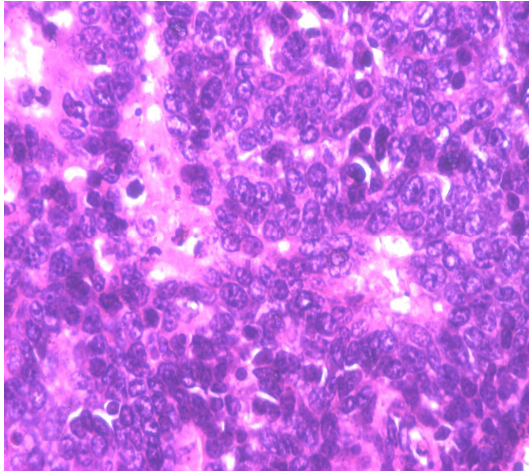


Perforin Perlakuan 1 dengan pembesaran 400X

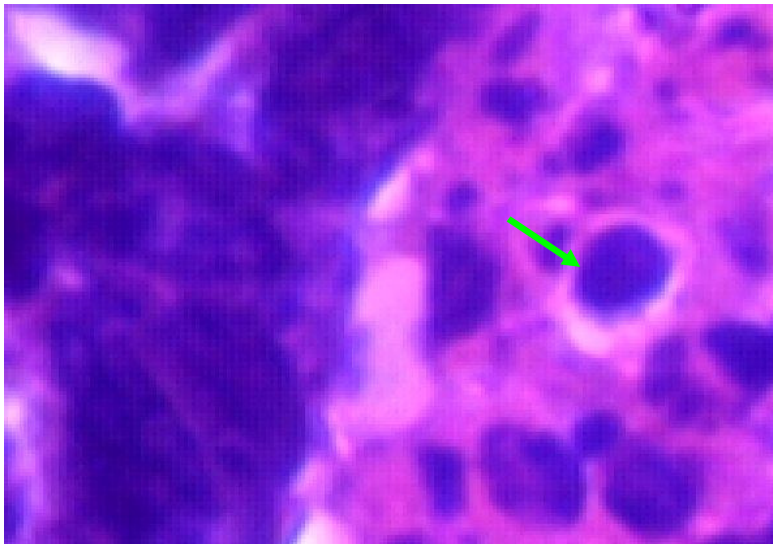


Perforin Perlakuan 2 dengan pembesaran 400X

Lampiran 2. Pemeriksaan HE dan Apoptotic bodies



Pewarnaan HE dengan pembesaran 400x



Tanda panah : Apoptotic Bodies (Inti basofilik dengan halo di sekitarnya)

Mean Apoptosis Body

Descriptives

Kelompok Perlakuan		Statistic	Std. Error		
Mean Apoptosis Body	Kontrol	Mean	7.9000	.60745	
		95% Confidence Interval for Mean	6.2134		
		Lower Bound	9.5866		
		Upper Bound			
		5% Trimmed Mean	7.9500		
		Median	7.9000		
		Variance	1.845		
		Std. Deviation	1.35831		
		Minimum	5.80		
		Maximum	9.10		
		Range	3.30		
		Interquartile Range	2.40		
		Skewness	-.970		.913
		Kurtosis	.667		2.000
	Perlakuan 1	Mean	10.9800	.34843	
		95% Confidence Interval for Mean	10.0126		
		Lower Bound	11.9474		
		Upper Bound			
		5% Trimmed Mean	10.9833		
		Median	11.3000		
		Variance	.607		
		Std. Deviation	.77910		
		Minimum	10.10		
		Maximum	11.80		
		Range	1.70		
		Interquartile Range	1.50		
		Skewness	-.380		.913
		Kurtosis	-2.892		2.000
	Perlakuan 2	Mean	12.1200	.41761	
		95% Confidence Interval for Mean	10.9605		
		Lower Bound	13.2795		
		Upper Bound			
		5% Trimmed Mean	12.1500		
		Median	12.5000		
		Variance	.872		
		Std. Deviation	.93381		
		Minimum	10.80		
		Maximum	12.90		
		Range	2.10		
		Interquartile Range	1.75		
		Skewness	-.785		.913
		Kurtosis	-1.515		2.000

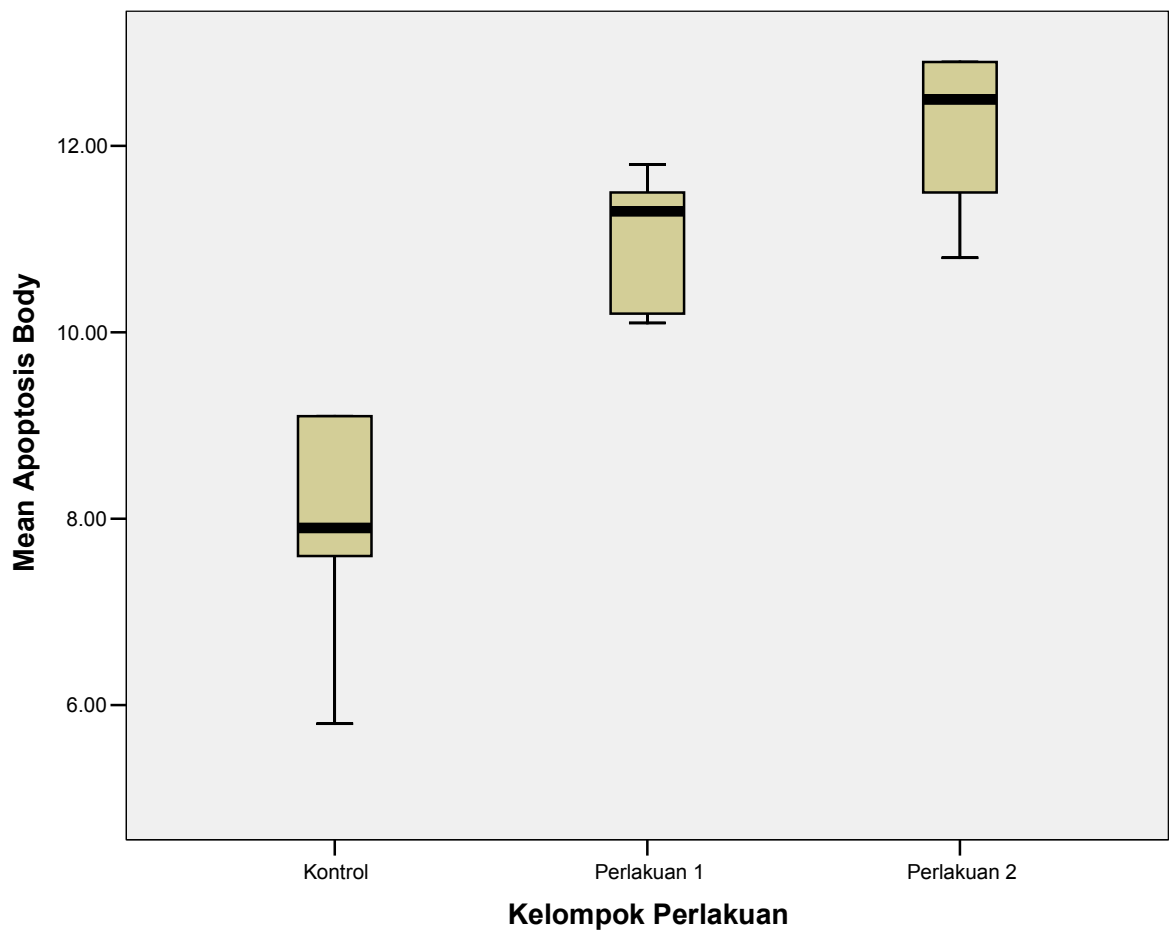
Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Mean Apoptosis Body	Kontrol	.213	5	.200*	.885	5	.33
	Perlakuan 1	.259	5	.200*	.858	5	.22
	Perlakuan 2	.258	5	.200*	.862	5	.23

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

a. Lilliefors Significance Correction

Detrended Normal Q-Q Plots

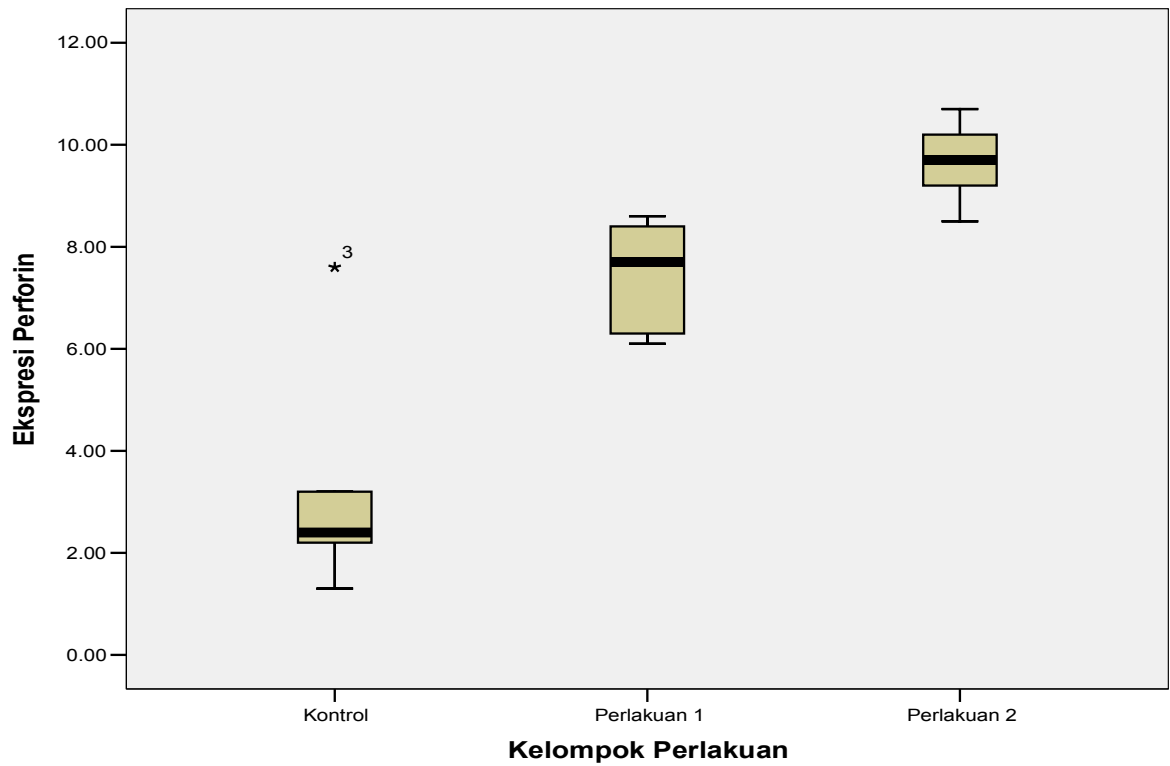


Ekspresi Perforin

Descriptives

Kelompok Perlakuan			Statistic	Std. Error
Ekspresi Perforin	Kontrol	Mean	3.3400	1.10707
		95% Confidence Interval for Mean	.2663	
		Lower Bound	6.4137	
		Upper Bound		
		5% Trimmed Mean	3.2167	
		Median	2.4000	
		Variance	6.128	
		Std. Deviation	2.47548	
		Minimum	1.30	
		Maximum	7.60	
		Range	6.30	
		Interquartile Range	3.65	
		Skewness	1.827	.913
		Kurtosis	3.621	2.000
			Perlakuan 1	Mean
95% Confidence Interval for Mean	5.9736			
Lower Bound	8.8664			
Upper Bound				
5% Trimmed Mean	7.4278			
Median	7.7000			
Variance	1.357			
Std. Deviation	1.16490			
Minimum	6.10			
Maximum	8.60			
Range	2.50			
Interquartile Range	2.30			
Skewness	-.290			.913
Kurtosis	-2.925			2.000
	Perlakuan 2			Mean
		95% Confidence Interval for Mean	8.5969	
		Lower Bound	10.7231	
		Upper Bound		
		5% Trimmed Mean	9.6667	
		Median	9.7000	
		Variance	.733	
		Std. Deviation	.85615	
		Minimum	8.50	
		Maximum	10.7	
		Range	2.20	
		Interquartile Range	1.60	
		Skewness	-.250	.913
		Kurtosis	-.764	2.000

Detrended Normal Q-Q Plot



ANOVA

		Sum of squares	df	Mean of square	F	sig
Mean Apoptosis Body	Between Groups	47.657	2	23.829	21.506	.000
	Within Groups	13.296	12	1.108		
	Total	60.953	14			
Ekspresi Perforin	Between Groups	102.677	2	51.339	18.741	.000
	Within Groups	32.872	12	2.739		
	Total	135.549	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Bonferroni

Dependent Variable	(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Mean Apoptosis Body	Kontrol	Perlakuan 1	-3.08000 *	.66573	.002	-4.9304	-1.2296
		Perlakuan 2	-4.22000 *	.66573	.000	-6.0704	-2.3696
	Perlakuan 1	Kontrol	3.08000 *	.66573	.002	1.2296	4.9304
		Perlakuan 2	-1.14000	.66573	.338	-2.9904	.7104
	Perlakuan 2	Kontrol	4.22000 *	.66573	.000	2.3696	6.0704
		Perlakuan 1	1.14000	.66573	.338	-.7104	2.9904
Ekspresi Perforin	Kontrol	Perlakuan 1	-4.08000 *	1.04677	.006	-6.9895	-1.1705
		Perlakuan 2	-6.32000 *	1.04677	.000	-9.2295	-3.4105
	Perlakuan 1	Kontrol	4.08000 *	1.04677	.006	1.1705	6.9895
		Perlakuan 2	-2.24000	1.04677	.161	-5.1495	.6695
	Perlakuan 2	Kontrol	6.32000 *	1.04677	.000	3.4105	9.2295
		Perlakuan 1	2.24000	1.04677	.161	-.6695	5.1495

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

Correlations

		Mean Apoptosis Body	Ekspresi Perforin
Mean Apoptosis Body	Pearson Correlation	1	.793**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	15	15
Ekspresi Perforin	Pearson Correlation	.793**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	15	15

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

