

**PERBEDAAN  
ANGKA KEJADIAN INFEKSI LUKA OPERASI  
HERNIORAFI TEKNIK LICHTENSTEIN MENGGUNAKAN  
MESH MONOFILAMEN MAKROPORI DENGAN HERNIORAFI  
TEKNIK SHOULDICE PADA OPERASI HERNIA  
INKARSERATA**

*The Difference of The Incidence of Surgical Site Infection between  
Lichtenstein Repair with Macroporous Monofilament Mesh and  
Shouldice Repair in Incarcerated Hernia*



**Tesis**

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat  
Sarjana S-2 dan Program Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Bedah**

**AHMAD ZUMARO**

**G. 4A. 003. 032**

**PROGRAM PASCASARJANA  
MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
DAN  
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS ILMU BEDAH  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG**

**2009**

**PENGARUH EKSTRAK MAHKOTA DEWA  
TERHADAP EKSPRESI GRANZYME SEL  
MONONUKLEAR SERTA PERKEMBANGAN MASSA  
TUMOR ADENOKARSINOMA MAMMA MENCIT  
C3H**

*THE INFLUENCE OF MAHKOTADEWA EXTRACT ON  
GRANZYME EXPRESSION OF MONONUCLEAR CELLS AND  
TUMOUR MASS PROGRESSION OF BREAST  
ADENOCARCINOMA C3H MICE*



**Tesis**

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

**Heri Sugianto**

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

## KATA PENGANTAR

Puji Syukur dipanjatkan kehadirat Allah SWT atas limpahan rahmat dan anugerahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul “Pengaruh ekstrak Mahkotadewa terhadap ekspresi granzyme sel mononuklear serta perkembangan massa tumor 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. Edi Dharmana, MSc, PhD, SpParK sebagai dosen pembimbing, penulis mengucapkan terima kasih atas bimbingan, sumbangan pikiran, serta kesabarannya dalam proses penyelesaian tesis ini.

Dalam kesempatan ini penulis juga menghaturkan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. dr. Susilo Wibowo, SpAnd, Rektor Universitas Diponegoro Semarang.
2. Prof. Drs. Y. Warella, MPA, PhD, Ketua Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro Semarang.
3. dr. Soejoto, SpKK(K), Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
4. DR. dr. Winarto, Sp.MK, Sp.M(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. Tim penguji dan dan nara sumber yang telah dengan sabar berkenan memberi masukan, arahan dalam penelitian dan penulisan tesis ini.
10. Semua rekan sejawat Residen Bedah FK UNDIP yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.
11. Ucapan terima kasih khusus kepada orang tua dan mertua saya, istri dan anak-anakku tercinta, 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, 4 juni 2009

Penulis

**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, 4 juni 2009

Penulis



## ABSTRAK

### PENGARUH EKSTRAK MAHKOTADEWA TERHADAP EKSPRESI GRANZYME SEL MONONUKLEAR DAN PERKEMBANGAN MASSA TUMOR ADENOKARSINOMA MAMMAE MENCIT C3H

**Latar belakang :** Mahkotadewa obat tradisional Indonesia yang banyak digunakan untuk anti kanker. Mahkotadewa mengandung *polyphenol* yang dapat memacu aktivasi sel *mononuklear* pada sistem perondaan imun terhadap sel-sel kanker. Aktifitas sel *mononuklear* dapat dilihat dari ekspresi *granzyme*. *Granzyme* akan menginduksi apoptosis yang kemudian akan mempengaruhi perkembangan massa tumor.

**Tujuan :** Membuktikan pengaruh dosis bertingkat ekstrak Mahkotadewa terhadap skor ekspresi *granzyme* sel *mononuklear* serta perkembangan massa tumor.

**Metoda :** penelitian *pre and post test only control group design*. Kelompok kontrol tanpa pemberian ekstrak Mahkotadewa, kelompok 1: 0,035mg/hari; kelompok 2: 0,0715 mg /hari dan kelompok 3 : 0,14 mg /hari. Setelah inokulasi tumor diberikan perlakuan 3 minggu, perkembangan tumor di ukur dengan caliper dan diperiksa ekspresi *granzyme* sel *mononuklear* secara imunohistokimia. Analisa statistik menggunakan *Kruskal-Wallis*, *Mann-Whitney* dan uji korelasi *Spearman*.

**Hasil :** Ekspresi *granzyme* K: 2,36 ,P1: 16,32 ,P2: 44,01 ,P3: 65,18. Perkembangan massa tumor K: 1,27 ,P1:0,42 ,P2: 0,10 ,P3: 0,09. Uji *Kruskal-Wallis* ekspresi *granzyme* dan perkembangan massa tumor di peroleh nilai  $p < 0,05$ . Uji *Mann-Whitney* ekspresi *granzyme* menunjukkan perbedaan bermakna pada semua kelompok perlakuan ( $p=0,009$ ). Pada perkembangan massa tumor menunjukkan perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan kecuali kelompok 2 dan 3 tidak bermakna ( $p=0,6$ ). Didapatkan korelasi negatif dengan koefisien korelasi - 0,857.

**Simpulan :** Dosis bertingkat ekstrak Mahkotadewa meningkatkan ekspresi *granzyme* dan penurunan perkembangan massa tumor.

**Kata kunci :** Mahkotadewa, *granzyme*, sel *mononuklear*, perkembangan massa tumor, adenokarsinoma mammae

## ABSTRACT

### THE INFLUENCE OF MAHKOTADEWA EXTRACT ON GRANZYME EXPRESSI OF MONONUCLEAR CELLS AND TUMOUR MASS PROGRESSION OF BREAST ADENOCARCINOMA C3H MICE

**Background:** Mahkotadewa generally used as traditional treatment of malignancy. It contains some compound of active *polyphenols* which could induce mononuclear cells activity. Mononuclear cells activity can be measured from *granzyme* expression as a response to malignant cells. *Granzyme* is able to induce apoptosis that will influence tumor mass progression.

**Objective:** To prove the influence of Mahkotadewa extract in gradual dose administration on *mononuclear cell granzyme* expression and tumor mass progression.

**Material and method:** A randomized post test only control group design was carried out for the study. The first group was control group, group-1 was administered with 0,035mg Mahkotadewa day, group-2: 0,0715mg/day, group-3: 0,14mg/day. After completed tumor cell inoculation, tumor mass progression and *mononuclear cels granzyme* expression was measured. *Kruskal-Wallis test*, *Mann-Whitney* and *Spearman Correlation* used as statistical analysis of *granzyme* expression and tumor mass progression.

**Result:** *Granzyme* expression K: 2,36 ,P1: 16,32 ,P2: 44,01 ,P3: 65,18. Tumor mass progression K: 1,27 ,P1:0,42 ,P2: 0,10 ,P3: 0,09. The *Kruskal-Wallis test* on *granzyme* expression and tumor mass progression showed a significant difference ( $p < 0,05$ ). *Mann-Whitney* test of *granzyme* expression result was significantly difference on all group ( $p = 0,009$ ). Tumor mass progression analysis result was significant difference on all group, except group 2 and 3 ( $p = 0,6$ ). The statistically significant negative correlation between *granzyme* expression score and tumor mass progression ( $cc -0,857$ ).

**Conclusion:** Administration of gradual dose Mahkotadewa extract could increase of the *granzyme* expression and decrease tumor mass progression significantly.

**Key words :** Mahkotadewa, *mononuclear cells* , *granzyme*, tumor mass progression, breast adenocarcinoma

## RIWAYAT HIDUP SINGKAT

### A. IDENTITAS

Nama : dr Heri Sugianto  
NIM Magister Biomedik : G4A003007  
NIM PPDS I Bedah : G3A003008  
Tempat / Tgl lahir : Blitar, 13 Januari 1972  
Agama : Islam  
Jenis Kelamin : Laki-laki

### B. Riwayat Pendidikan

1. SD Negeri Duren II – Blitar : Lulus tahun 1983
2. SMP Negeri Talun – Blitar : Lulus tahun 1986
3. SMA Negeri I Wlingi – Blitar : Lulus tahun 1989
4. FK UNISULLA – Semarang : Lulus tahun 1998
5. Dokter Puskesmas Tambaruntung- Kalsel : Tahun 1998 – 2000.
6. Dokter Rumah Sakit Amaliyah – Brebes : Tahun 2000 – 2003
7. PPDS I Bedah FK UNDIP – Semarang
8. Magister Ilmu Biomedik Pasca Sarjana Undip Semarang

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
ABSTRAK ( bahasa Indonesia ).....	xv
ABSTRAK ( bahasa Inggris ).....	xvi
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar belakang .....	1
1.2. Rumusan masalah .....	4
1.3. Tujuan penelitian .....	4
1.3.1. Tujuan umum .....	4
1.3.2. Tujuan khusus .....	4
1.4. Manfaat penelitian .....	5
1.5.Orisinalitas.....	5

	Halaman
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
2.1. Kanker payudara .....	6
2.1.1. Etiologi dan patogenesis .....	6
2.1.2. Perkembangan massa tumor .....	7
2.2 . Respon imunologik terhadap sel tumor .....	8
2.3. Mekanisme efektor dalam melawan tumor .....	10
2.3.1. Limfosit T sebagai efektor anti tumor . .....	10
2.3.2. Sel Natural Killer (NK) sebagai efektor anti tumor .....	13
2.4. Granzyme .....	17
2.5 Mahkotadewa.....	20
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS</b> .....	22
3.1. Kerangka teori .....	22
3.2. Kerangka Konsep .....	23
3.3. Hipotesis Penelitian .....	23
3.3.1 Hipotesis Mayor.....	23
3.3.2 Hipotesis Minor.....	23
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN</b> .....	24
4.1. Rancangan penelitian .....	24
4.2. Sampel penelitian .....	25
4.3. Waktu dan lokasi penelitian .....	25
4.4. Variabel penelitian .....	26

	Halaman
4.4.1. Variabel bebas .....	26
4.4.2. Variabel perantara .....	26
4.4.3. Variabel tergantung.....	26
4.4.4. Definisi operasional .....	26
4.5. Bahan dan alat penelitian .....	27
4.5.1 Bahan untuk perlakuan .....	27
4.5.2. Bahan transplantasi jaringan tumor pada mencit .....	28
4.5.3. Bahan untuk pemeriksaan histopatologi rutin .....	28
4.5.4. Bahan tambahan untuk pewarnaan imunohistokimia .....	29
4.5.5. Alat transplantasi jaringan tumor pada mencit .....	29
4.5.6. Alat tambahan untuk pewarnaan imunohistokimia.....	29
4.5.7. Alat untuk pengukuran diameter tumor .....	30
4.5.8. Alat untuk pengamatan dan dokumentasi sediaan .....	30
4.6. Pelaksanaan penelitian .....	30
4.7. Alur kerja .....	31
4.8. Prosedur pemeriksaan .....	32
4.8.1. Prosedur transplantasi tumor .....	32
4.8.2. Prosedur pengukuran diameter tumor .....	33
4.8.3. Prosedur pembuatan preparat histopatologi .....	33
4.9. Cara mengumpulkan data .....	35

	Halaman
4.10. Analisis data .....	36
<b>BAB 5 HASIL</b> .....	<b>37</b>
<b>BAB 6 PEMBAHASAN</b> .....	<b>42</b>
<b>BAB 7 SIMPULAN DAN SARAN</b> .....	<b>45</b>
DAFTAR PUSTAKA .....	46

**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
Gambar-1 Tahapan sitolitik sel target.....	12
Gambar-2 Jalur Apoptosis Sel Target yang diinduksi oleh Granzyme B.....	17
Gambar-3 Struktur kristal kimia dari granzyme B.....	19
Gambar-4 Buah Mahkota Dewa.....	20
Gambar-5 Kerangka teori.....	22
Gambar-6 Kerangka konsep.....	23
Gambar-7 Skema rancangan penelitian.....	24
Gambar-8 Alur kerja.....	31
Gambar-9 Hasil boxplot ekspresi granzyme.....	39
Gambar10 Hasil boxplot perkembangan massa tumor.....	40

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel-1 Nilai rata-rata perhitungan ekspresi Granzyme.....	37
Tabel-2 Nilai rata-rata perkembangan tumor.....	37
Tabel-3 Uji normalitas data pada semua kelompok percobaan.....	38
Tabel-4 Hasil uji Lavene (Test of Homogeneity of Variances.).....	38
Tabel-5 Uji Spearman.....	41

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
1. Lampiran hasil perhitungan statistik dengan SPSS 15.0 for Windows.....	50
2. Lampiran Foto Mencit C3H.....	60
3. Lampiran hasil pemeriksaan mikroskopik tumor.....	61
4. Ethical Clearence	

# **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 di diagnosis menderita karsinoma mamma invasif. 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 wanita<sup>1</sup>. Data BRK-IAPI (Badan Registrasi Kanker Ikatan Ahli Patologi Indonesia) 1994 menunjukkan 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<sup>2</sup>. 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<sup>3</sup>. Di Asia Tenggara pada tahun 2000 didapatkan 55.907 kasus baru dan 24.967 kasus meninggal<sup>4</sup>.

Hasil survei kesehatan rumah tangga (SKRT) Departemen Kesehatan RI menunjukkan angka kematian karena kanker payudara meningkat yaitu pada tahun 1972: 1,4%, tahun 1980:3,4% tahun 1986: 4,3%, dan tahun 1992:4,4%<sup>5,6</sup>. Cara pengobatan kanker payudara yang berlaku selama ini adalah dengan

pembedahan, radioterapi, imunoterapi dan kemoterapi. Pembedahan dan Radioterapi bersifat terapi definitif lokal, sedangkan secara sistemik, di mana sel kanker menyebar atau bermetastasis dilakukan dengan kemoterapi. Kemoterapi pada kanker payudara dilakukan dalam bentuk regimen yang mempunyai angka keberhasilan didasarkan atas evaluasi pada *objective response rate* pasca kemoterapi (partial response dan complete response – CR/PR) , diberikan dalam berbagai regimen dengan CR/PR antara 22% - 70%<sup>7</sup>. 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.

Respons imun merupakan hasil interaksi antara antigen dengan sel-sel imunokompeten, termasuk mediator-mediator yang dihasilkannya. Respon Imun terhadap tumor terdiri dari 3 fase : kognitif, aktivasi dan efektor yang tergantung terutama pada tiga tipe sel yaitu makrofag, limfosit T sitotoksik (CTL) dan sel natural killer (NK).<sup>8-12</sup> CTL dan sel-NK mengekspresikan *perforin* dan *granzyme* yang akan menyebabkan apoptosis pada sel tumor.<sup>13-15</sup> Apoptosis dari sel-sel tumor ini akan berpengaruh pada pertumbuhan tumor yang diukur dari ukuran massa tumor.

Zat-zat immunomodulator banyak terdapat pada tanaman obat. 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.

Mahkotadewa (*Phaleria macrocarpa*) merupakan salah satu tanaman obat tradisional Indonesia yang masih belum memiliki acuan informasi yang lengkap, baik dari segi farmakologi maupun fitokimia. Pemanfaatan Mahkotadewa sebagai obat anti kanker masih merupakan pengalaman empiris semata, sehingga manfaatnya harus dibuktikan secara ilmiah karena tanpa pembuktian ilmiah penggunaan Mahkotadewa sebagai anti kanker akan sangat terbatas<sup>18,19</sup>. Suatu penelitian awal terhadap ekstrak Mahkotadewa menunjukkan adanya kandungan zat aktif berupa senyawa *polyphenol, alkaloid, terpenoid, saponin*.<sup>18,19</sup>

Di Gamaleya Institute of Microbiology and Epidemiology, Moscow, Russia dan Chittaranjan National Cancer Institute, Kolkata, India beberapa peneliti – yang meneliti efek kandungan *polyphenol* pada salah satu tanaman obat mengemukakan bahwa *polyphenol* alamiah dapat menstimulasi produksi Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) dan Interleukin-2 (IL-2) dalam suatu populasi imunosit. IFN- $\gamma$  dan IL-2 sangat penting dalam memacu aktivasi CTL dan sel NK pada sistem perondaan imun terhadap sel-sel kanker<sup>8,16,17</sup>.

Dalam penelitian ini akan dilihat pengaruh dosis bertingkat ekstrak Mahkotadewa terhadap ekspresi *granzyme* sel *mononuclear*. Alasan dipilihnya Mahkotadewa karena penggunaannya sebagai antikanker telah banyak, tetapi sangat sedikit bukti ilmiah yang mendukung. Dan dipilihnya ekspresi *granzyme* sel *mononuclear* karena *granzyme* merupakan zat yang secara langsung akan menginduksi timbulnya apoptosis pada sel kanker sehingga berpengaruh

terhadap perkembangan tumor kelenjar mamma pada mencit C3H. Pemberian dosis bertingkat ekstrak (0mg/hr, 0,035mg/hr, 0,0715mg/hr dan 0,14mg/hr) Mahkotadewa di harapkan memberi informasi tentang ekspresi *granzyme* dan perkembangan tumor mamma pada mencit C3H pada dosis yang bertingkat.

## **1.2 Rumusan masalah**

Dari uraian di atas, dapat kami simpulkan beberapa permasalahan yaitu :

Apakah ada pengaruh ekspresi *granzyme* sel *mononuklear* dengan perkembangan massa tumor adenokarsinoma mamma pada mencit yang diberi dosis bertingkat ekstrak Mahkotadewa ?

## **1.3 Tujuan penelitian**

### 1.3.1. Tujuan umum :

Membuktikan pengaruh dosis bertingkat Mahkotadewa terhadap ekspresi *granzyme* sel *mononuklear* dan perkembangan massa tumor adenokarsinoma mamma.

### 1.3.2. Tujuan khusus :

1.3.2.1. Membuktikan adanya perbedaan ekspresi *granzyme* sel mononuklear antar kelompok mencit dengan adenokarsinoma mamma yang diberi dosis bertingkat Mahkotadewa.

1.3.2.2. Membuktikan adanya perbedaan perkembangan massa tumor adenokarsinoma mamma antar kelompok mencit yang diberi dosis bertingkat Mahkota dewa.

1.3.2.3. Menganalisis pengaruh antara ekspresi *granzyme* sel *mononuklear* dengan perkembangan massa tumor adenokarsinoma mamma pada mencit yang diberi dosis bertingkat Mahkotadewa.

#### 1.4 Manfaat penelitian

Apabila pada penelitian ini terbukti adanya perbedaan pada ekspresi *granzyme* dan perkembangan massa tumor antar kelompok yang diberi dosis bertingkat Mahkotadewa, maka penggunaan Mahkotadewa sebagai imunostimulan pendamping terapi anti kanker perlu dipertimbangkan.

Dengan adanya penelitian ini akan menambah khasanah ilmu baik di bidang Onkologi, Imunologi, dan akan menambah khasanah baru di bidang *herbal medicine*, dengan kehadiran profil *herbal medicine* baru *Phaleria macrocarpa*.

Bila hasil penelitian terbukti manfaat tanaman obat ini, maka penelitian uji coba pra klinik ini dapat dikembangkan menjadi penelitian klinik.

#### 1.5. ORISINALITAS

Penulis	Judul	Hasil
R.Sumastuti dan Sonlimar N ( FK UGM )	Efek Sitotoksik Ekstrak Buah dan Daun Mahkotadewa ( <i>Phaleria macrocarpa</i> (sheff boer) terhadap Sel Hela	Buah dan Daun Mahkotadewa mempunyai efek menghambat pertumbuhan sel hela (sel kanker rahim )
Selamat Budijitno (Tesis S2 FK UNDIP 2006)	Pengaruh Ekstrak <i>Phaleria macrocarpa</i> terhadap skor ekspresi perforin CTL dan Sel NK serta indeks apoptosis pada Adenocarsinoma Mamma Mencit C3H	Terdapat beda ekspresi perforin antara kelompok kontrol dengan kelompok P2 dan P3 (p<0,001) dan antara kelompok P1 dengan P2 dan P3 (p<0,001) ,Indeks apoptosis berbeda antara semua kelompok(p<0,001)Adahubungan kuat antara ekspresi perforin dengan indek apoptosis (r=0.946)

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Kanker payudara**

##### 2.1.1. Etiologi dan patogenesis

Ada 3 pengaruh penting pada kanker payudara :

a. Faktor genetik

Faktor genetik berpengaruh dalam peningkatan terjadinya kanker payudara. Pada percobaan tikus dengan galur sensitif kanker, melalui persilangan genetik didapatkan tikus yang terkena kanker . Ada faktor turunan pada suatu keluarga yang terkena kanker payudara. kelainan ini diketahui terletak dilokus kecil di kromosom 17q21 pada kanker payudara yang timbul saat usia muda<sup>20-22</sup>.

b. Hormon

Kelebihan hormon *estrogen endogen* atau lebih tepatnya terjadi ketidak seimbangan hormon terlihat sangat jelas pada kanker payudara. Banyak faktor risiko yang dapat disebutkan seperti pada wanita masa reproduksi yang lama, nulipara, dan usia tua saat mempunyai anak pertama akan meningkatkan estrogen pada siklus menstruasi. Epitel payudara normal memiliki reseptor estrogen dan progesteron. Kedua reseptor ditemukan pada sebagian besar kanker payudara. Berbagai bentuk *growth promoters (transforming growth factor-alpha / epithelial growth factor, platelet- derived growth*

*factor*), *fibroblast growth factor* dan *growth inhibitor* disekresi oleh sel kanker payudara manusia. Banyak penelitian menyatakan bahwa *growth promoters* terlibat dalam mekanisme *autokrin* dari tumor. Produksi GF tergantung pada hormon *estrogen*, sehingga Interaksi antara hormon di sirkulasi , reseptor hormon di sel kanker dan GF autokrin merangsang sel tumor menjadi lebih progresif.<sup>20-22</sup>

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<sup>22,23</sup>.

2.1.2. Perkembangan massa tumor :

Perkembangan massa tumor dengan dua cara yaitu<sup>24</sup> :

- a. Secara eksponensial yaitu dari satu sel menjadi 2 sel, 4 sel, 8 sel, dan seterusnya sampai menjadi  $2^n$  sel sampai terbentuk gerombolan sel tumor. Makin besar tumor makin cepat tumor itu tumbuh. Untuk mengukur kecepatannya tumbuh dipakai parameter waktu ganda (doubling time) yaitu waktu yang di perlukan oleh suatu tumor untuk membesar sehingga volumenya menjadi dua kali semula. Setelah tumor mencapai ukuran tertentu pertumbuhan tumor beralih ke pertumbuhan gompertz.
- b. Pertumbuhan gompertz yaitu pertumbuhan melambat dengan makin besarnya tumor, karena keterbatasan pasokan darah, ruang tumbuh dan

daya imunitas tubuh. Jadi didalam suatu tumor selalu ada kelompok sel yang tumbuh, sel yang tidak tumbuh dan ada kelompok sel yang hilang karena mati.

Faktor yang mempengaruhi kecepatan tumbuh tumor payudara<sup>24</sup> :

a. faktor penderita :

- umur penderita : pada usia muda umumnya pertumbuhan lebih cepat.
- Jenis kelamin : pertumbuhan pada wanita lebih cepat karena di pengaruhi oleh hormon estrogen .
- Imunitas penderita.

b. Faktor tumor :

- derajat keganasan tumor.
- Rasio sel yang tumbuh di banding sel yang tidak tumbuh dan sel yang mati.

## **2.2 . Respons imunologik terhadap sel tumor**

Respons imun merupakan hasil interaksi antara antigen dengan sel-sel *imunokompeten*, termasuk mediator-mediator yang dihasilkannya. Limfosit merupakan unit dasar terbentuknya respons imun karena mampu berdiferensiasi menjadi seri lainnya serta mengenal sekaligus bereaksi dengan antigen. Sel mononuklear yaitu CTL dan sel NK dapat bertindak sebagai *efektor* dalam respon imun dan berperan sebagai regulator respon imun karena kemampuannya dalam mempengaruhi aktivitas sel *imunokompeten* lainnya melalui limfokin yang dilepaskannya.<sup>8, 10-12, 25</sup>

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 T-*sitotoksik* dan sel NK harus mampu mengenal antigen tumor dan memperantarai/menyebabkan kematian sel-sel tumor.

8,20

Beberapa bukti yang mendukung bahwa ada peran sistem imun dalam melawan tumor ganas diperoleh dari beberapa penelitian diantaranya :

- 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* bahkan *imunosupresi* seringkali mendahului pertumbuhan tumor;

Bukti lain yang juga mendukung bahwa tumor dapat merangsang sistem imun adalah ditemukannya limfosit berproliferasi dalam kelenjar getah bening. Kelenjar getah bening ini merupakan *draining sites* dari pertumbuhan tumor disertai peningkatan ekspresi MHC dan *Interseluler adhesion molecule* (ICAM) yang mengindikasikan sistem imun yang aktif. <sup>8, 10-12, 26</sup>

Sel imun yang berada di sekitar sel kanker yang berperan dalam perondaan terhadap kanker adalah CTL, Sel NK dan makrofag . Setelah mengenal sel kanker sebagai sel asing, ketiga sel imun tersebut akan menghancurkan sel kanker. <sup>8-12,20,26</sup>

Sel CTL dan sel NK melakukan cara sitotoksitas yang sama yaitu dengan mengeluarkan *perforin* dan *granzyme* <sup>8,20</sup>. Dalam memproses antigen tumor *in vivo* akan melibatkan baik respon imun humoral maupun seluler. Sampai saat ini belum ada bukti antibodi secara sendiri dapat menghambat perkembangan / pertumbuhan sel tumor. Dengan demikian respon imun humoral dalam bentuk antibodi terhadap tumor selalu memerlukan bantuan efektor imun seluler. <sup>8,10,20</sup> Komponen efektor pada sistem imun yang memiliki kemampuan bereaksi dengan sel tumor ialah limfosit T, *antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC), sel NK dan makrofag <sup>8,11,15,20</sup>

### **2.3. Mekanisme efektor dalam melawan tumor**

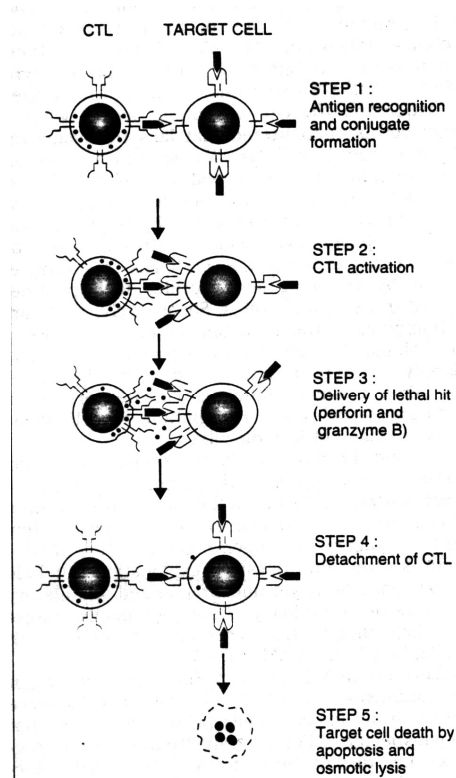
#### **2.3.1. Limfosit T sebagai efektor anti tumor**

Subpopulasi limfosit T ; limfosit *T-helper* dan CTL 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, mengaktivasi sel T-sitotoksik untuk menghancurkan sel tumor tersebut. Sebagian kecil dari sel tumor juga mengekspresikan antigen tumor bersama molekul MHC kelas II, sehingga

dapat dikenali dan membentuk kompleks dengan limfosit *T-helper* (CD4) dan mengaktivasi sel *T-helper* terutama *subset* Th1 untuk mensekresi limfokin IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$ . Kedua sitokin ini akan merangsang sel tumor untuk lebih banyak lagi mengekspresikan molekul MHC kelas I, sehingga akan lebih mengoptimalkan sitotoksitas dari sel T-sitotoksik .<sup>8,11,15,20</sup>

Pada banyak penelitian terbukti bahwa sebagian besar sel Efektor yang berperan dalam mekanisme anti tumor adalah CTL yang berperan untuk membunuh 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 melisiskan sel tumor. Walaupun respon CTL mungkin tidak efektif untuk menghancurkan tumor, peningkatan respons CTL merupakan cara pendekatan terapi antitumor yang menjanjikan dimasa mendatang. Sel T CD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> yang diaktifasi oleh antigen tumor dapat mensekresi TNF dan IFN $\gamma$  yang mampu meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I sehingga meningkatkan sensitivitas tumor terhadap lisis oleh sel CTL. Sebagian

kecil tumor yang mengekspresikan MHC kelas II dapat mengaktivasi sel CD4<sup>+</sup> 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 se-sel tumor yang mati kepada sel T CD4<sup>+</sup>, sehingga terjadi aktivasi sel-sel tersebut<sup>12</sup>. Proses sitolitik CTL terhadap sel target dengan penggunaan enzim *perforin dan granzyme*. Ada beberapa langkah proses sitolitik CTL terhadap sel target. <sup>8,11,15,20</sup>



**Gambar-1.** Tahapan sitolitik sel target oleh CTLs. <sup>8</sup>

#### 2.3.4. 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, yang membedakan adalah bahwa sel NK melakukan sitotoksisitas terhadap sel tumor tanpa melalui ekspresi antigen tumor bersama molekul MHC kelas I “(MHC-unrestricted manner)”. Secara *in vitro*, sel NK dapat menginduksi apoptosis 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 Fc $\gamma$ RIII 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.<sup>8,20,11,15,27</sup>

Sitotoksisitas alami yang diperankan oleh sel NK merupakan mekanisme efektor yang sangat penting dalam melawan tumor. Sel NK adalah sel efektor dengan sitotoksisitas spontan terhadap berbagai jenis sel sasaran dan sitotoksisitasnya tidak bergantung pada MHC.<sup>8,11,15,20</sup>

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 CTL 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 dapat diarahkan untuk melisis sel yang dilapisi *imunoglobulin* karena ia mempunyai reseptor Fc (FcRIII atau CD 16) untuk molekul IgG. 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-K, yang mengikat molekul semacam lektin<sup>8, 11, 15, 20, 27</sup>

Aktivitas sel NK dihambat oleh antigen HLA-G yang diekspresikan oleh sel tumor, tetapi sel tumor jarang yang mengekspresikan antigen HLA-G. Transkripsi HLA-G berupa mRNA cukup sering dijumpai pada berbagai jenis tumor, sehingga diduga ekspresi antigen HLA-G dikontrol ditingkat pasca transkripsi.<sup>8, 20, 27</sup>

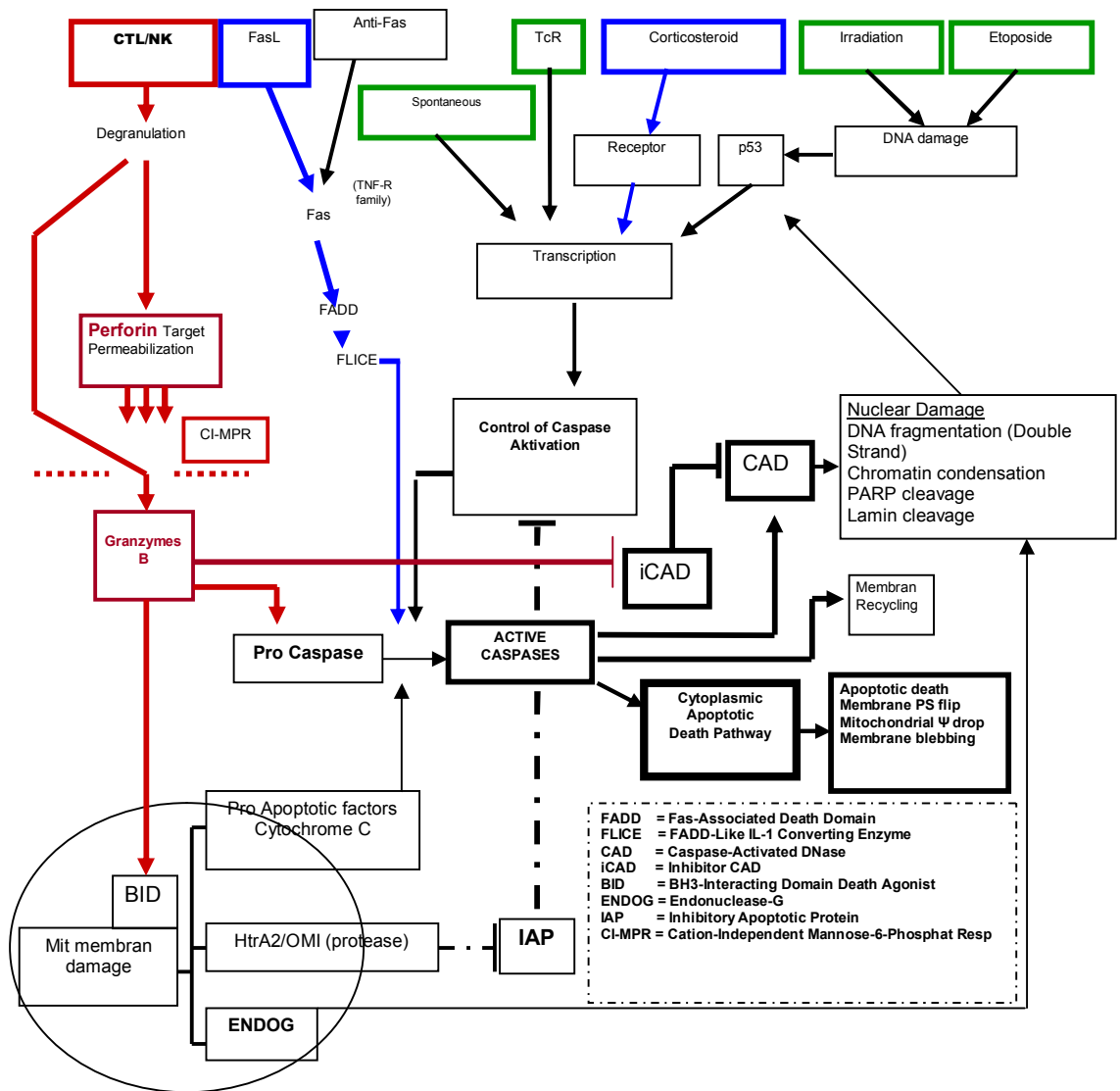
Kemampuan sel NK membunuh sel tumor ditingkatkan oleh sitokin, termasuk IFN, TNF, IL-2 dan IL-12. Karena itu peran sel NK dalam aktivitas anti tumor bergantung pada rangsangan yang terjadi secara bersamaan pada sel T dan makrofag yang memproduksi sitokin tersebut.<sup>8</sup> Ketiga jenis IFN ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) dapat meningkatkan fungsi sel NK. IFN mengubah pre-NK menjadi sel NK yang mampu mempermudah interaksi dengan antigen tumor dan lisis sel sasaran.<sup>8</sup> Sel NK mungkin berperan

dalam *immune surveillance* terhadap tumor yang sedang tumbuh, khususnya tumor yang mengekspresikan antigen virus.<sup>8</sup> 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.<sup>8,20,27,28</sup> 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<sup>8,15,27</sup>.

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 di-aktivasi dengan cyclophosphamide (cy) menunjukkan bahwa sel-sel itu gagal mencegah metastasis<sup>8,11</sup>.

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 (*eksositosis*)<sup>12,19,26</sup>. Granula CTL dan sel NK mengandung *perforin*, *sitotoksin*, *serine esterase (granzyme)* dan *proteoglikan*<sup>8</sup>. 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.<sup>8,18,22,23,27,29</sup>

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).<sup>10,11,17,22,30</sup> secara bersama-sama jalur granul (*eksositosis* dan FASL). *Granzyme* akan mengaktifkan procaspase endogen pada sel target. Aktifitas *caspase* merupakan bagian dari jalur kematian *apoptosis* pada umumnya. *Inhibitor caspase* akan menghambat *apoptosis* dari jalur rusaknya nukleus; tetapi tidak menghambat apoptosis karena kerusakan yang bukan dari kerusakan inti tetapi hilangnya mitokondria potensial.<sup>8,22,28,13</sup>



Gambar 2. Jalur Apoptosis sel target yang di induksi oleh Granzyme B<sup>13,30,34</sup>

## 2.5. Granzyme

*Granzyme* merupakan molekul yang termasuk dalam famili serin protease, yang diekspresikan secara eksklusif oleh sel mononuklear (CTL dan sel-NK) yang merupakan komponen sistem imun 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 *granzyme-granzyme* lain.<sup>13,32</sup>

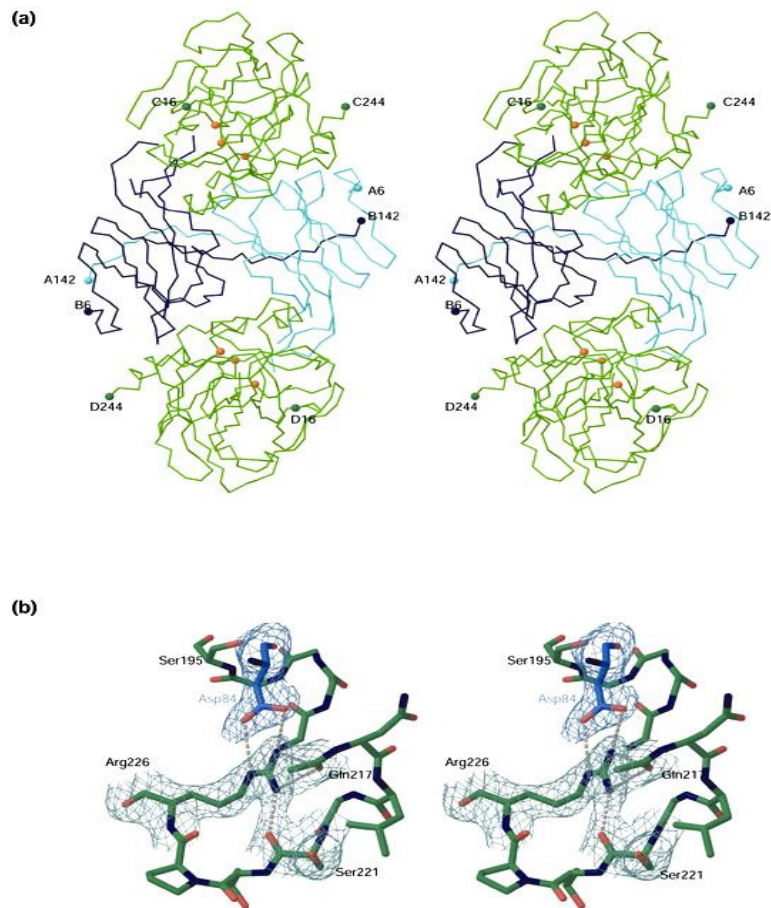
*Granzyme* merupakan 90% total massa granula sitolitik, khususnya *secretory lysosome* dari CTL dan sel NK. Secara struktur kimiawi sangat dekat dengan *chymotrypsin*, dengan tiga residu kunci pada *catalytic site*-nya yaitu histidin, asam aspartat, dan serin. Pada tikus diidentifikasi 8 macam *granzym* yaitu *granzyme* A-G dan M, sedangkan pada manusia diidentifikasi *granzyme* B, A, H, M dan *granzyme-3* atau *tryptase-2*.<sup>13,32</sup>

Pada gambar-3 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).<sup>13,32</sup>

*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*.



**Gambar-3.** Struktur kristal kimia dari *granzyme* B. <sup>32</sup>

Seluruh *granzyme* disintesis sebagai zymogen, dan setelah berikatan dengan peptida utama, aktifitas enzymatik maksimal diperoleh dengan lepasnya sebuah dipeptida amino terminal. Seluruh aktivitas *granzyme* 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*.<sup>13,32</sup>

## 2.7. Mahkotadewa

Mahkotadewa dalam bahasa latin di kenal dengan istilah *Phaleria macrocarpa* termasuk dalam familia *Thymelaeaceae*. Kajian pustaka yang telah ada menyebutkan bahwa genus *Phaleria* umumnya memiliki aktifitas antimikroba, hal ini berkaitan dengan toksisitas tanaman yang cukup tinggi untuk pertahanan diri. Adanya aktifitas antimikroba ini berhubungan dengan potensi antikanker terhadap sel pada siklus tertentu.<sup>18</sup>



Gambar-4. Buah Mahkotadewa.<sup>18</sup>

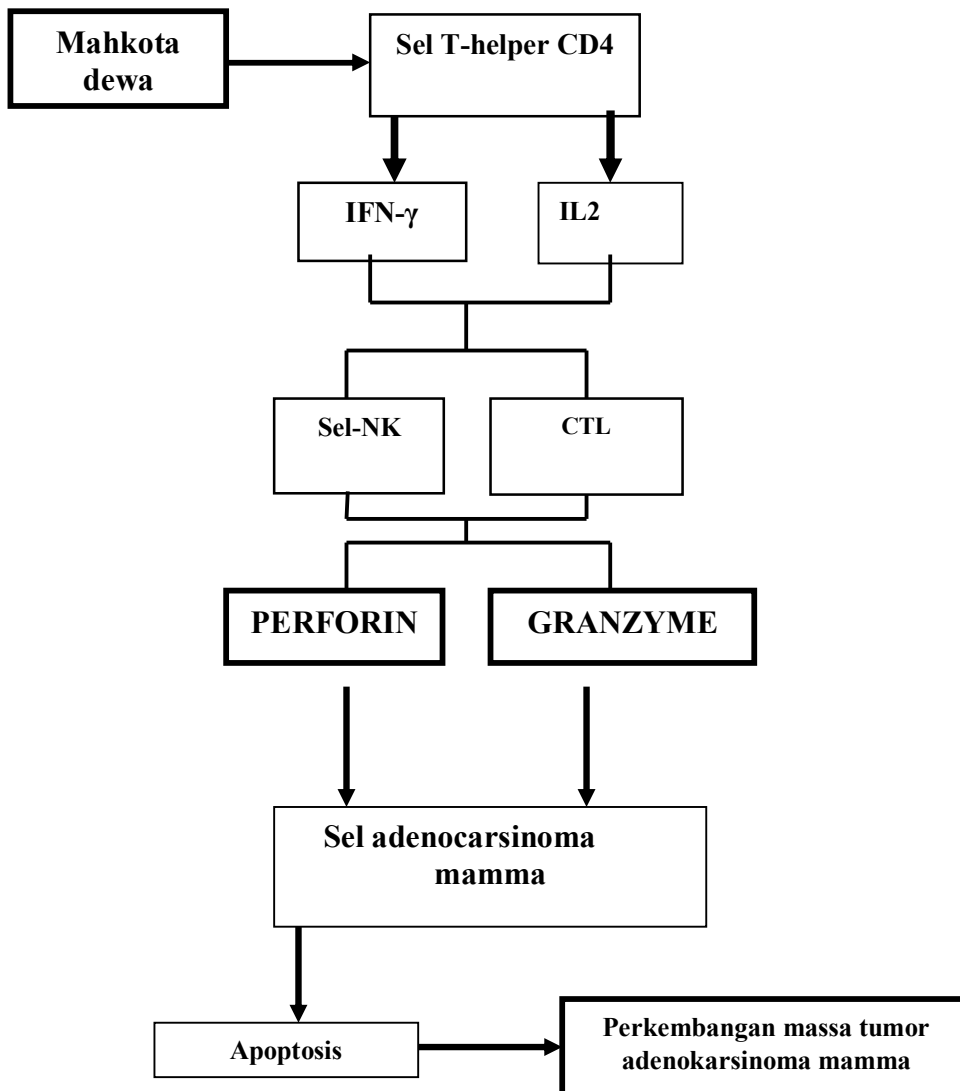
Ekstrak terhadap daging buah dan kulit bij mahkotadewa menunjukkan adanya zat aktif *polyphenol*, *alkaloid*, *terpenoid* dan *saponin* <sup>18,19</sup>. Pengujian dengan larva udang *Artemia salina Leach* memberikan hasil LC50 berkisar antara 0,1615 – 11,8351 µg/ml. Pengujian dengan sel Leukemia L1210. Dari hasil pengujian ekstrak, diketahui IC50nya sangat rendah yaitu <10 µg/ml (4,99 – 7,71 µg/ml), dengan batas IC50 suatu ekstrak tanaman untuk dapat dinyatakan

berpotensi sebagai suatu antikanker adalah 10 µg/ml<sup>18</sup>, Sumastuti membuktikan bahwa Mahkotadewa menghambat pertumbuhan sel hela (sel kanker rahim)<sup>19</sup>.

Pada penelitian yang dilakukan Tazulakhova dari Gamaleya Institute of Microbiology and Epidemiology, Moscow – Rusia dan Chittaranjan National Cancer Institute, Kolkata - India mengemukakan bahwa *polyphenol* alamiah dapat menstimulasi produksi Interferon- $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) dan Interleukin-2 (IL-2) dalam suatu populasi immunosit yang kemudian akan memacu aktivasi CTL dan sel NK pada sistem perondaan imun terhadap sel-sel kanker<sup>16,17</sup> Penelitian lain yang dilakukan oleh Selamat B dkk pada adenokarsinoma mamma mencit C3H membuktikan bahwa pemberian dosis bertingkat *Phaleria makrocarpa* akan meningkatkan skor ekspresi *perforin* CTL dan sel-NK serta meningkatkan indeks apoptosis sel-sel tumor secara signifikan.<sup>34</sup>

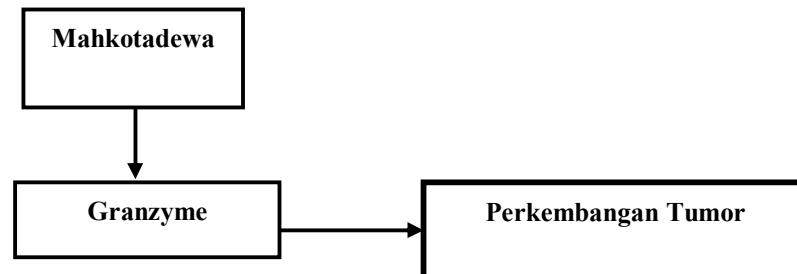
**BAB 3**  
**KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS**

**3.1. Kerangka teori**



**Gambar-5. kerangka teori**

## 3.2. Kerangka Konsep



Gambar-6. kerangka konsep

## 3.3. Hipotesis Penelitian

### 3.3.1 Hipotesis Mayor

Terdapat pengaruh ekspresi *granzyme* sel mononuklear dengan perkembangan massa tumor adenokarsinoma mamma pada mencit yang diberi dosis bertingkat ekstrak Mahkotadewa

### 3.3.2 Hipotesis Minor

3.3.2.1 Terdapat perbedaan ekspresi *granzyme* sel mononuklear antar kelompok mencit yang diberi dosis bertingkat Mahkotadewa.

3.3.2.2. Terdapat perbedaan perkembangan massa tumor adenokarsinoma mamma antar kelompok mencit yang diberi dosis bertingkat Mahkotadewa.

3.3.2.3. Terdapat pengaruh antara ekspresi *granzyme* sel mononuklear dengan perkembangan massa tumor adenokarsinoma mamma antar kelompok mencit yang diberi dosis bertingkat Mahkotadewa.

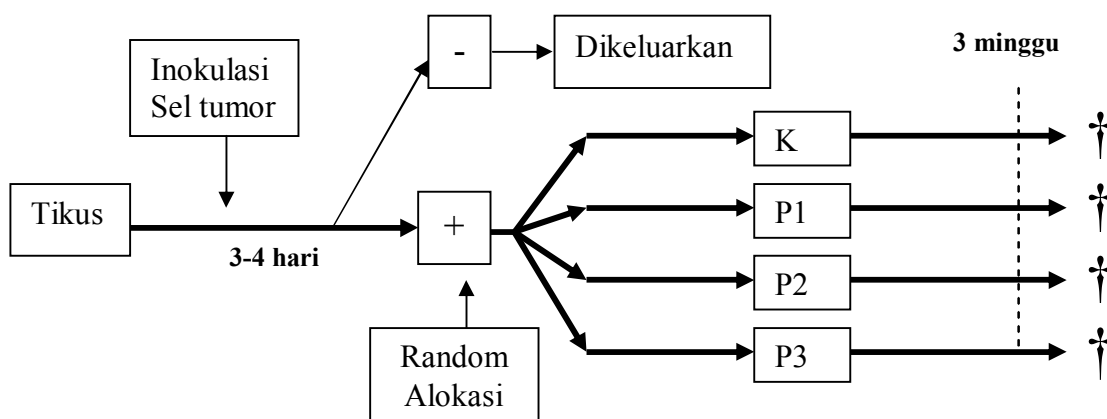
## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1. Rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain "*Pre and post test control group design*". Kelompok penelitian dibagi menjadi 4 yaitu kelompok Kontrol (K), Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2), dan Perlakuan 3 (P3). Adapun pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

- K : Kelompok Kontrol, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan, tidak mendapat Mahkotadewa
- P1 : Kelompok Perlakuan 1, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan, mendapat Mahkotadewa 0,035mg /hari (0,175 mL /hari)
- P2 : Kelompok Perlakuan 2, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat Mahkotadewa 0,0715 mg /hari (0,36 mL /hari)
- P3 : Kelompok Perlakuan 3, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat Mahkotadewa 0,14 mg /hari (0,7 mL /hari)

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



**Gambar 7.** Skema rancangan penelitian

#### **4.2. Sampel penelitian**

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

Kriteria Inklusi:

- a. Mencit betina umur 6 bulan.
- b. Strain C3H
- c.. Berat badan 20-30gram
- d. Antomis tampak normal.

Kriteria Eksklusi:

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

Besar sampel menurut WHO tiap kelompok minimal 5 ekor <sup>35</sup> , pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok 5 ekor tikus.

Randomisasi: 20 mencit yang sudah berhasil diinokulasi dikelompokkan secara random menjadi 4 kelompok yaitu:

Kelompok K : 5 mencit

Kelompok P1 : 5 mencit

Kelompok P2 : 5 mencit.

Kelompok P3 : 5 mencit

#### **4.3. Waktu dan lokasi penelitian**

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 6 bulan. Perlakuan pada mencit dan proses pengambilan jaringan dilakukan di Laboratorium

Biokimia FK Universitas Diponegoro, proses pembuatan blok parafin dan pewarnaan imunohistokimia – dengan teknik *Avidin-Biotin-peroxidase Complex* (ABC) yang dipakai pada *paraffin embedded tissue* dengan fiksasi buffer formalin dan pewarnaan *antibody monoclonal anti-granzyme* – dilakukan di Lab Patologi Anatomi FK Universitas Gajah Mada / RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta.

#### **4.4. Variabel penelitian**

##### 4.4.1. Variabel bebas

Ekstrak Mahkotadewa

##### 4.4.2. Variabel perantara

Ekspresi *granzyme* sel mononuklear.

##### 4.4.3. Variabel tergantung

Perkembangan massa tumor.

##### 4.4.4. Definisi operasional

1. Ekstrak Mahkotadewa adalah ekstrak yang berasal dari daging buah kering, yang diekstraksi dengan pelarut etanol 70% menggunakan metoda sokletasi dengan konsentrasi larutan hasil ekstrak 0,2mg/mL.<sup>34</sup>

Skala variabel : rasio

2. Ekspresi *granzyme* dihitung dari jumlah semua sel mononuklear yang berwarna coklat pada setiap 100 sel mononuklear dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x dengan metode Aihara<sup>34,38</sup>.

Skala variabel : interval

3. Perkembangan massa tumor didapat dengan menghitung ukuran diameter tumor menggunakan alat caliper tumor (CaliPro<sup>R</sup>), diukur pada diameter terbesar tumor. Satuan ukurannya adalah *centimeter*.

Skala variabel : interval.

#### **4.5. Bahan dan alat penelitian**

##### 4.5.1 Bahan untuk perlakuan

Hewan coba adalah mencit betina strain C3H dengan umur 6 bulan, dan berat 20 - 30 gram. Mencit diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Selama percobaan, hewan coba ditempatkan pada kandang dan diberi pakan dan minum secara *ad libitum*. Sebelum perlakuan, mencit menjalani masa adaptasi selama 1 minggu.

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.

Mahkotadewa yang digunakan adalah ekstrak Mahkotadewa , diperoleh dengan cara <sup>34,36</sup> :

- 1 kg daging buah Mahkotadewa yang telah dikeringkan ditumbuk halus, kemudian serbuk dimasukkan ke dalam alat soklet (kapasitas

50gr) dan dilakukan ekstraksi dengan cara sokletasi menggunakan pelarut etanol dengan siklus 8 – 10 kali.

- Hasil ekstrak dimasukkan dalam *labu rotary evaporator* dan dilakukan destilasi vakum hingga menjadi pekat (suhu 40°C).
- Ekstrak dikeringkan dalam *oven* dengan suhu 40°C selama 1 jam untuk menguapkan etanol.
- Didapatkan hasil 5,5gr ekstrak pada setiap 1 kg bahan (0,55%), dan hasil ekstrak diencerkan dengan aquabidest sampai tercapai konsentrasi 0,2mg/mL .

Dosis yang digunakan adalah disetarakan dengan dosis yang telah digunakan pada manusia yaitu dari serbuk daging buah 5 gram 1 x sehari dikalikan konstanta uji terapi pada hewan coba (mencit) yaitu 0,0026 dikalikan konstanta hasil ekstrak 0,0055<sup>34,36</sup> sehingga dosis yang diberikan adalah  $5000 \times 0,0026 \times 0,0055 = 0,0715$  mg/hari (0,36 mL). Selain itu juga diberikan dosis 0,035mg (0,18 mL)/hari dan 0,14 mg (0,72 mL)/hari.

#### 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, xylol
- c. Parafin cair (Histoplast)
- d. Albumin dan Poly-L-Lysine
- e. Bahan pengecatan Hematoksin-Eosin (HE)
- f. Canada balsam dan Entelan

#### 4.5.4. Bahan tambahan untuk pewarnaan imunohistokimia

- a. Antibodi primer: *Mouse Monoclonal Antibody (MoAb) anti-granzyme (Novocastra visionbiosystem<sup>R</sup>)*
- b. *Kit Universal Streptavidin-Biotin (EnVision-DakoCytomation<sup>R</sup>)*

#### 4.5.5. Alat transplantasi jaringan tumor pada mencit

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

#### 4.5.6. Alat tambahan untuk pewarnaan imunohistokimia

- a. Pensil PAP
- b. *Waterbath*
- c. Tempat pewarnaan dan pencucian
- d. *Timer*
- e. Pipet serologic
- f. Kertas saring

- g. *Freezer*
- h. *Microwave Toshiba<sup>R</sup>*
- i. Tabung plastic dan pipet *Ependorf*
- j. *Epismikrometer sekuler*

#### 4.5.7. Alat untuk pengukuran diameter tumor

Caliper merk *Calipro<sup>R</sup>* dengan ketepatan  $10^{-2}$

#### 4.5.8. Alat untuk pengamatan dan dokumentasi sediaan adalah :

- 1 Unit *Multi Head Microscope Olympus<sup>R</sup>*
- *Nikon<sup>R</sup> Digital Net Camera DN 100 + SD Card*
- 1 Unit Personal Computer *Intel Pentium<sup>R</sup> Processor*

### **4.6. Pelaksanaan penelitian**

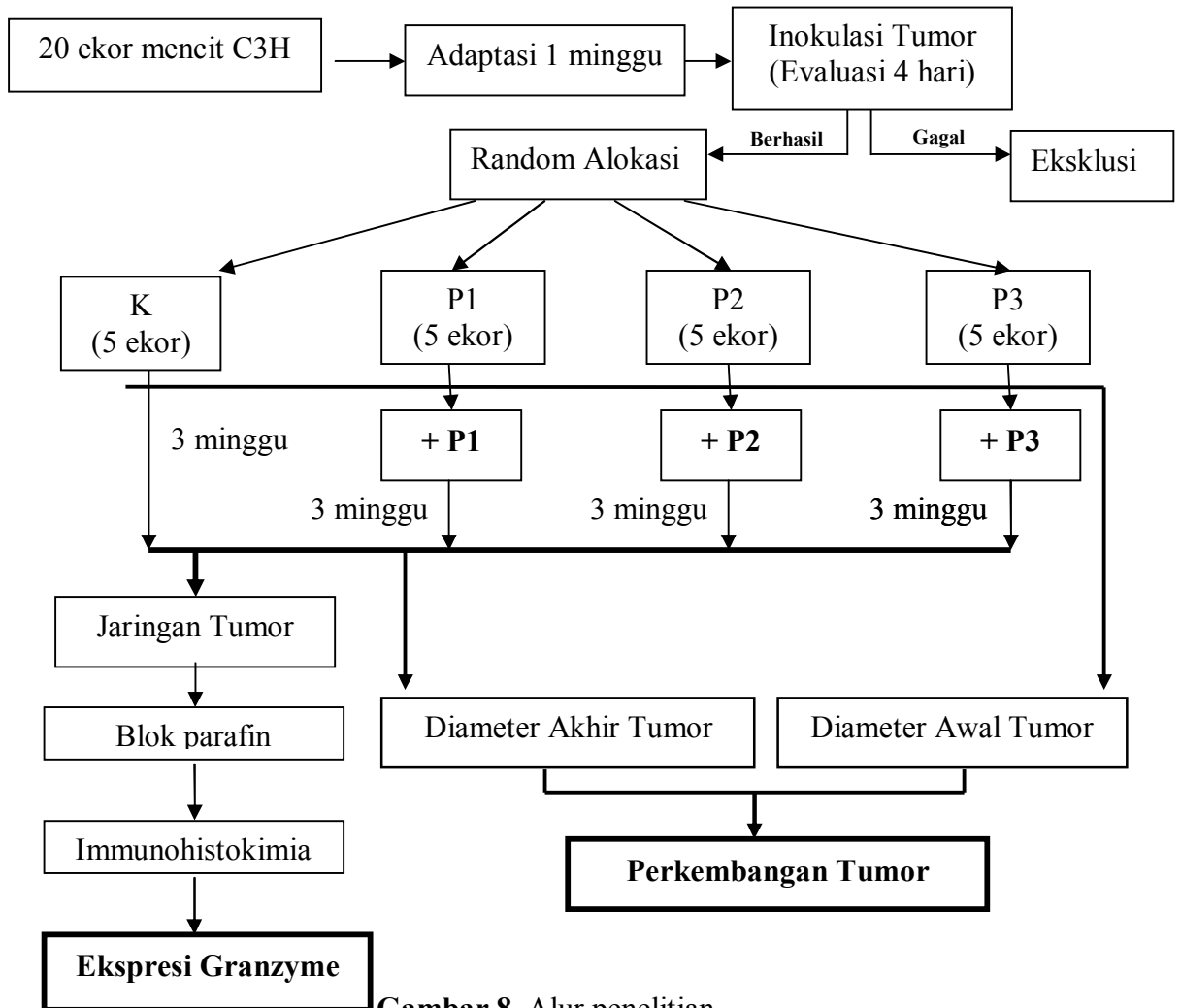
#### Cara perlakuan

Dua puluh ekor mencit betina strain C3H diadaptasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransum pakan standard selama 1 minggu secara ad libitum.

Dua puluh ekor mencit tersebut kemudian diinokulasi tumor, diamati selama 4 hari. Pada kelompok mencit yang berhasil diinokulasi dibagi menjadi 4 kelompok yang ditentukan secara acak. Masing-masing kelompok dikandangkan secara individual dan mendapatkan pakan standard yang sama dan minum ad libitum dan diukur diameter tumornya. Kemudian diberikan perlakuan selama 3 minggu, dan pemberian ekstrak dilakukan dengan pipet mikro.

Setelah perlakuan selesai, diameter tumor diukur kembali. Mencit di anaestesi dengan ether selanjutnya mencit dibunuh dengan cara di dislokasi cervical-nya, kemudian diambil jaringan tumor. Jaringan tumor di proses menjadi preparat histologi setelah di buat blok paraffin dan satu preparat dari kelompok kontrol di periksa Patologi Anatomi untuk memastikan jenis tumornya. Hasil pemeriksaan Patologi Anatomi jenis tumornya adalah Adenokarsinoma ductus invasive mamma grade II ( deferensiasi moderat ).

#### 4.7. Alur kerja



Gambar 8. Alur penelitian

## **4.8. Prosedur pemeriksaan**

### 4.8.1. 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. Tumor diletakkan di cawan petri kecil yang telah terlebih dahulu dicuci dengan garam fisiologis dan diletakkan diatas es.
- d. 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.
- e. Bubur tumor disuntikkan subkutan di aksila kanan ke arah jalur susu (milk streak) mencit dengan dosis 0,2 ml menggunakan spuit insulin dengan ketepatan  $10^{-1}$ .
- f. Sisa tumor yang padat dimasukkan ke dalam botol formalin untuk dibuat sediaan mikroskopik.

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

#### 4.8.2. Prosedur pengukuran diameter tumor

Massa tumor diukur menggunakan caliper (CaliPro<sup>R</sup>) dengan ketepatan  $10^{-2}$ . Kita ukur tumor pada diameter terlebar dengan ukuran satu dimensi.

#### 4.8.3. Prosedur pembuatan preparat histopatologi

##### a. Fiksasi

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

##### b. Dehidrasi

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

##### c. *Impregnasi*

Jaringan dimasukkan dalam paraffin cair selama 2x2 jam.

##### d. *Embedding* .

Jaringan ditanam dalam paraffin padat yang mempunyai titik lebur 56-58<sup>0</sup>C, ditunggu sampai paraffin padat. Jaringan dalam paraffin dipotong

setebal 4 mikron dengan mikrotom. Potongan jaringan ditempelkan pada kaca obyek yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Jaringan pada kaca obyek dipanaskan dalam incubator suhu 56-58<sup>0</sup>C sampai paraffin mencair.

e. Prosedur pewarnaan *Mo Ab Anti granzyme*

- Xylo I.....5-10 menit
- Xylo II.....5-10 menit
- Alkohol absolut .....10 menit
- Alkohol 95% .....5-10 menit
- Alkohol 70% .....5-10 menit
- Cuci air (celup-celup) .....1-2 menit
- Cuci dengan Phospat buffer saline (PBS) celup-celup.....1-2 menit
- Slide dimasukkan kedalam tempat yang lembab dan tertutup
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 (sampai mendidih )
- Keluar dari microwave didiamkan sampai dingin selama 20-40 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 lembab tertutup dan simpan dalam lemari es bawah supaya tidak mengering

Cuci PBS (celup-celup) .....10 menit

Cuci PBS .....2-3 menit

Streptavidin .....10 menit

Cuci PBS .....2-3 menit

DAB .....3 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 Mayer-Hematoksilin .....20'-1 menit

Hematoksilin dibuang, cuci air mengalir kemudian dicelup di aquadest

Entellan kemudian tutup deck glass. <sup>34,37</sup>

#### **4.9. Cara mengumpulkan data**

Dari masing-masing kelompok diukur diameter tumor sebelum dan sesudah perlakuan, dan diambil massa tumornya setelah perlakuan yang selanjutnya dibuat preparat setebal 6 mikron, diwarnai dengan pengecatan Immunohistokimia dengan metoda *Avidin-Biotin Peroksidase Complex*

dengan *mouse MoAb anti-granzym* kemudian di amati ekspresi granzyme-nya.

#### **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 *granzyme* dan perkembangan tumor adenokarsinoma payudara disajikan dalam bentuk tabel rerata, SD dan median.

Pada penelitian ini karena ada satu variabel *independent discreet* yaitu pemberian dosis bertingkat ekstrak Mahkotadewa, dan dua variabel *dependent* berskala interval yaitu ekspresi *granzyme* dan perkembangan massa tumor yang secara *biological aspect* terdapat hubungan dan data tidak homogen maka kedua variabel tersebut dianalisis dengan uji *Kruskal Wallis* , yang dilanjutkan dengan *Post Hoc Test*. Uji korelasi antara variabel ekspresi *granzyme* dengan perkembangan masa tumor dilakukan dengan uji korelasi *Spearman's*.<sup>39-41</sup>

Batas derajat kemaknaan adalah apabila  $P \leq 0,05$ . Analisa data dilakukan dengan *software SPSS Ver. 15.0 for Windows*.

## BAB 5

### HASIL

#### 5.1. Ekspresi *Granzyme*

Hasil perhitungan ekspresi *granzyme* disajikan pada tabel berikut :

**Tabel 1.** Nilai rata-rata hasil penghitungan ekspresi *granzyme* pada tiap kelompok percobaan

Kel percobaan	N	Min	Max	Mean	Median	SD
kontrol	5	1,25	3,26	2.442	2.360	0,8310
1	5	4.24	22.54	16.328	20.060	7.9016
2	5	35.64	58.64	44.01	40.160	9.7767
3	5	60.27	68.14	65.188	66.330	3.1886

p<0,05

#### 5.2. Perkembangan massa tumor.

**Tabel 2.** Nilai rata-rata hasil pengukuran perkembangan massa tumor

Kelompok perlakuan	N	Delta Min	Delta Max	Mean	Median	SD
kontrol	5	1,25	1,29	1.272	1.270	0,01789
1	5	0,12	0,69	0,424	0.450	0,24296
2	5	0,07	0,13	0,100	0.100	0,08408
3	5	0,00	0,20	0,090	0.050	0,00840

P<0,05

#### 5.3 Uji Statistik.

Penelitian ini dilakukan pada 20 sampel, di dapatkan data tidak homogen dilakukan analisa statistik dengan uji *Kruskal Wallis* dan *post hoc* dengan uji *Mann-Whitney*.

Pada eksplorasi data, uji normalitas data masing- masing kelompok dengan menggunakan *shapiro-wilk* test didapatkan :

**Tabel -3.** uji normalitas semua percobaan dengan uji Shapiro-Wilk.

	N	P
Post-pre	20	0,095
Ekspresi granzyme	20	0,682

Dari tabel di atas terlihat bahwa distribusi data adalah normal. Sedangkan uji homogenitas data tiap kelompok perlakuan dengan uji *Levene* didapatkan :

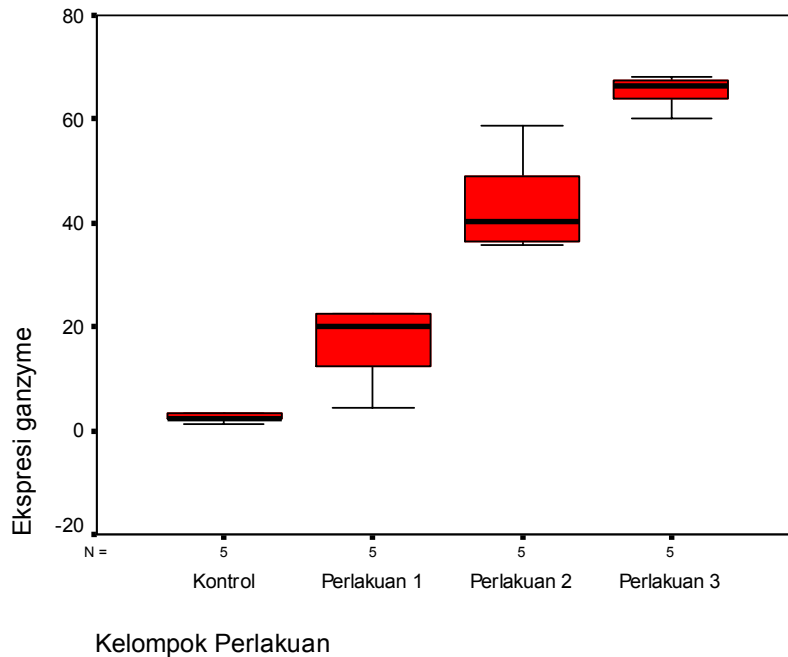
**Tabel -4.** Hasil Uji Levene ( Test of Homogeneity of Variances )

	Mean ± SD	P
Post-pre	0,4720±0.50751	<,0001
Ekspresi granzyme	31,9920±31,9920	,003

Hasil uji *Levene* didapatkan  $p < 0,05$  yang artinya data tidak homogen, kemudian dilakukan tranformasi data dan hasilnya tetap menunjukkan data tidak homogen, maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis*.

### 5.3.1 Ekspresi granzyme

Uji *Kruskal-Wallis* pada ekspresi *granzyme* diperoleh nilai  $p < 0,0001$ . oleh karena nilai  $p < 0,05$  maka dapat di ambil kesimpulan bahwa paling tidak terdapat perbedaan ekspresi *granzyme* antar kelompok perlakuan. Untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan maka perlu dilakukan analisa *Post hoc* dengan uji *Mann-Whitney*.



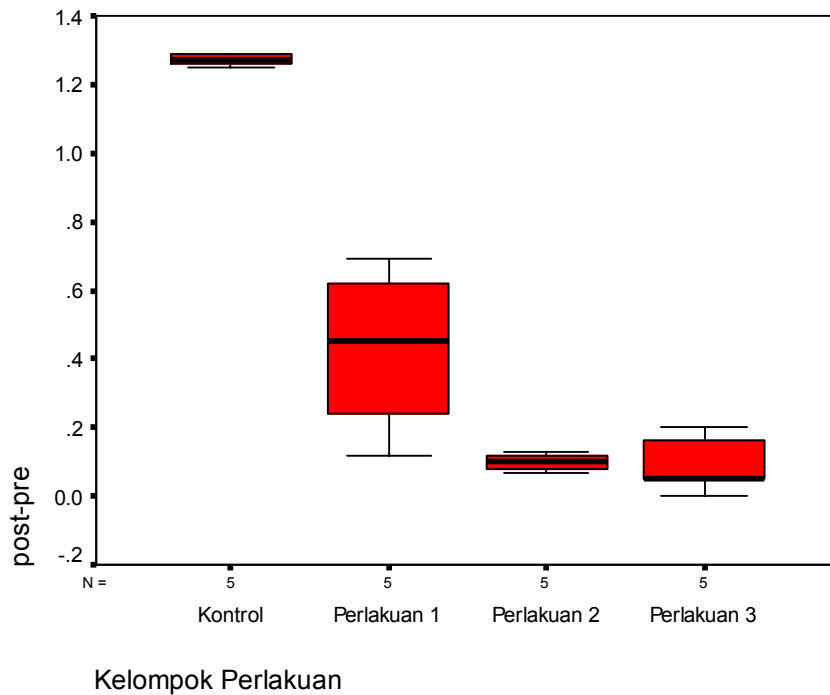
**Gambar 9.** Hasil boxplot ekspresi *granzyme*.

Pada kelompok kontrol (K) dengan ekspresi *granzyme* ( $2,442 \pm 0,831$ ) dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 (P1) dengan ekspresi *granzyme* ( $16,328 \pm 7,901$ ), kelompok perlakuan 2 (P2) dengan ekspresi *granzyme* ( $44,01 \pm 9,776$ ) dan kelompok perlakuan 3 (P3) dengan ekspresi *granzyme* ( $65,188 \pm 3,188$ ) didapat perbedaan yang bermakna ( $p=0,009$ ). Pada kelompok perlakuan 1 dibandingkan dengan perlakuan 2 serta perlakuan 3 di dapat perbedaan bermakna ( $p=0,009$ ). Antara kelompok perlakuan 2 dan perlakuan 3 didapat perbedaan yang bermakna ( $p=0,009$ ).

### 5.3.2 Perkembangan tumor

Uji *Kruskal-Wallis* pada perkembangan massa tumor diperoleh nilai  $p=0,002$ . oleh karena nilai  $p < 0,05$  maka dapat di ambil kesimpulan bahwa paling

tidak terdapat perbedaan perkembangan massa tumor antar kelompok perlakuan. Untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan maka perlu dilakukan analisa *Post hoc* dengan uji *Mann-Whitney*.



**Gambar 10.** hasil box plot perkembangan massa tumor

Pada kelompok kontrol (K) dengan perkembangan tumor ( $1,27 \pm 0,17$ ) dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 (P1) dengan perkembangan massa tumor ( $0,424 \pm 0,24$ ), kelompok perlakuan 2 (P2) dengan perkembangan massa tumor ( $0,100 \pm 0,084$ ) dan kelompok perlakuan 3 (P3) dengan perkembangan massa tumor ( $0,092 \pm 0,008$ ) didapatkan perbedaan yang bermakna ( $p=0,009$ ). Antara perlakuan 1 dan perlakuan 2 di dapat perbedaan bermakna ( $p=0,021$ ) dan kelompok perlakuan 1 dan perlakuan 3 didapat perbedaan yang bermakna ( $p=0,028$ ). Kelompok perlakuan 2 dan perlakuan 3 tidak didapat perbedaan yang bermakna ( $p=0,600$ ).

### 5.3.3 Uji Spearman's

Pada uji *Spearman's* antar variable dependent di dapatkan hubungan korelasi negative yang bermakna ( $p < 0,05$ ) dengan koefisien korelasi  $-0,857$  artinya bila ekspresi *granzyme* meningkat maka terjadi penurunan perkembangan massa tumor.

**Tabel 5.** uji *Spearman's* variabel perkembangan massa tumor dan ekspresi *granzyme*

**Correlations**

			post-pre	Ekspresi granzyme
Spearman's rho	post-pre	Correlation Coefficient	1.000	-.857**
		Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	20	20
	Ekspresi <i>granzyme</i>	Correlation Coefficient	-.857**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.000	.
		N	20	20

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

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Pembahasan hasil penelitian ini disesuaikan dengan alur penelitian dan hipotesis yang telah dibuktikan. Hasil uji *Kruskal-Wallis* pada ekspresi *granzyme* di peroleh nilai  $p < 0,0001$  yang berarti terdapat perbedaan ekspresi *granzyme* antar kelompok perlakuan . Kemudian dilanjutkan dengan *post hoc test* dengan uji *Mann-Whitney* dan di dapatkan peningkatan dosis ekstrak Mahkotadewa akan meningkatkan ekspresi *granzyme* secara bermakna ( $p=0,009$ ). Pada kelompok perlakuan 1 dengan dosis Mahkotadewa sebesar 0,035 mg/hari terdapat peningkatan ekspresi *granzyme* yang bermakna dibanding dengan kelompok kontrol ( $p=0,009$ ) . Pada pemberian dengan dosis 0,0715 mg/hari terjadi peningkatan yang lebih tinggi dan bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol dan perlakuan 1. Pada pemberian dengan dosis 0,14mg/hari tetap meningkat secara bermakna terhadap kelompok kontrol, kelompok 1 dan kelompok 2. Ini berarti peningkatan dosis ekstrak Mahkotadewa menyebabkan peningkatan ekspresi *granzyme*.

Pada penelitian ini terbukti bahwa Mahkotadewa dapat memacu sel mononuklear (CTL dan sel NK) untuk mengekspresikan *granzyme*. Peningkatan ekspresi *granzyme* ini dapat disebabkan karena adanya *polyphenol* atau zat-zat lain yang terkandung dalam ekstrak Mahkotadewa seperti *alkaloid* ,*terpenoid*, *saponin*. *Polyphenol* dalam ekstrak Mahkotadewa menstimulasi produksi IFN-  $\gamma$  dan IL-2 dalam suatu populasi imunosit yang kemudian memacu aktivasi CTL

dan sel NK pada sistem perondaan imun terhadap sel-sel kanker<sup>13,15,16,17</sup>. 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 (*eksositosis*)<sup>12,19,26</sup>. Granula CTL dan sel NK mengandung *perforin*, *sitotoksin*, *serine esterase (granzyme)* dan *proteoglikan*. *Perforin* akan menimbulkan lubang pada membran sel target, dimana lubang tersebut merupakan pintu masuk bagi molekul *granzyme* dalam sitoplasma dan inti sel yang menyebabkan kematian dari sel target.<sup>8,18, 22, 23,27,29</sup> Penelitian lebih lanjut atas zat-zat aktif pada Mahkotadewa perlu dilakukan untuk mengetahui apakah ketiga zat tersebut memacu produk sitokin.

Pada perkembangan massa tumor didapatkan adanya perbedaan yang bermakna antara kontrol dengan seluruh kelompok perlakuan ( $p=0,009$ ), hal ini sesuai dengan hipotesis yaitu akan terjadi perbedaan bermakna pada seluruh kelompok percobaan. Peningkatan dosis ekstrak Mahkotadewa akan menyebabkan penurunan perkembangan massa tumor secara bermakna. Tetapi pada kelompok perlakuan 2 dengan pemberian dosis Mahkotadewa sebesar 0,0715mg/hari di banding dengan kelompok perlakuan 3 pada pemberian dosis 0,14 mg/hari tidak didapatkan penurunan massa tumor yang bermakna ( $p=0,600$ ). Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan dosis akan menghasilkan penurunan perkembangan massa tumor yang bermakna, tetapi pada dosis tertentu laju penurunan perkembangan massa tumor akan melambat.

Hal ini bisa diterangkan bahwa *Polyphenol* dalam ekstrak Mahkotadewa dapat menstimulasi IL-2 dan IFN- $\gamma$  yang kemudian memacu aktivasi CTL dan

sel-NK<sup>8,16,17</sup> sehingga meningkatkan ekspresi *perforin* dan *granzyme* yang akan menginduksi apoptosis yang menyebabkan penurunan perkembangan tumor<sup>8,16,32</sup>. Hal ini juga di dukung penelitian yang menyatakan pemberian Mahkotadewa akan meningkatkan ekspresi *perforin* dan indek opoptosis.<sup>34</sup>

Hasil uji korelasi *Spearman* pada ekspresi *granzyme* dan perkembangan massa tumor menunjukkan hubungan terbalik yang bermakna secara statistik dengan koofisien korelasi – 0,857. Hal ini berarti peningkatan ekspresi *granzyme* akan menyebabkan penurunan perkembangan massa tumor.

Ekstrak Mahkotadewa mempunyai potensi sebagai imunostimulator yang dapat digunakan sebagai terapi pendamping pada penggunaan sitostatika. Peneliti menyadari masih banyak hal yang harus di teliti untuk melengkapi menyempurnakan penelitian ini dan bila memungkinkan penelitian ini di tingkatkan menjadi uji klinis pada manusia.

## **BAB 7**

### **SIMPULAN DAN SARAN**

#### **7.1. Simpulan**

1. Terdapat perbedaan bermakna ekspresi *granzyme* sel mononuklear antar kelompok mencit C3H dengan adenokarsinoma mamma yang mendapat dosis bertingkat Mahkotadewa.
2. Terdapat perbedaan bermakna penurunan perkembangan massa tumor antar kelompok mencit C3H dengan adenokarsinoma mamma yang mendapat dosis bertingkat Mahkotadewa dengan penurunan perkembangan massa tumor terbesar pada P2.
3. Didapatkan korelasi negatif kuat antara ekspresi *granzyme* dan penurunan perkembangan massa tumor pada mencit C3H dengan adenokarsinoma mamma yang mendapat dosis bertingkat Mahkotadewa.

#### **7.2. Saran**

Untuk menyempurnakan konsep pemikiran pada penelitian ini, masih diperlukan penelitian lebih lanjut, misalnya ekspresi IL2 dan IFN

## DAFTAR PUSTAKA

1. Kols Adrienne. Breast Cancer : Increasing Incidence, Limited Option. The Outlook June 2002; Vol 19, Number 4 (revised).
2. Sugito H. Kanker di Indonesia tahun 1994: Data Histopatologik. Badan Registrasi Kanker Ikatan Ahli Patologi Indonesia. Jakarta (INA): Dirjen YanMed Dep. Kes RI; 1994. p. 3-6.
3. Sarjadi, Trihartini. Cancer registration in Indonesia. Asian Pasific. J Cancer 2001;2:21-4.
4. Imaginis – Breast Cancer : Statistics on Incidence, Survival, and Screening. Imaginis corp 2004.
5. Pokok-pokok penanggulangan penyakit kanker di Indonesia. Jakarta (INA): Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 1989. p. 1.
6. Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT). Jakarta (INA): Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan RI dan Biro Pusat Statistik; 1992. p. 44.
7. Beretta G. Cancer treatment medical guide. 10<sup>th</sup> ed. Milan: Farmitalia Carlo Erba-Erbamont; 1991. p. 174-6.
8. Abbas A, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 5<sup>th</sup> 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.
9. Stites DP, Terr Abba I, Parslow TP, .Medical Immunology, 9<sup>th</sup> ed, Stamford Connecticut, USA: Appleton & Lange, 1997.
10. Goodman JW. The immune response. In: Stites DP, Terr A I editors. Basic and Clinical Immunologi. 8<sup>th</sup> ed. USA: Prentice-Hall Int; 1998. p. 40-9.
11. Roitt IM. Immunology, 8<sup>th</sup> ed. Barcelona: Times Miror International; 1994. p. 21-8.
12. 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.
13. Lieberman J. The ABCS of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. Nat Rev Immunol 2003;5(3):361-70.

14. Henkart PA. Molecular mechanism of lymphocytes-mediated cytotoxicity molecular mechanism of T lymphocyte apoptosis. Pierre Henkart laboratory. Available from:  
URL: <http://www3.cancer.gov/intra/EIB/henkart.htm> . di unduh tgl 14- 4- 2009.
15. 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.
16. Amit KT, Madhumita R, Bhattacharya RK. Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. Current Science 2001;80(11):1387-96.
17. [Tazulakhova EB](#), [Parshina OV](#), [Guseva TS](#), [Ershov FI](#). Russian experience in screening, analysis, and clinical application of novel interferon inducers. J Interferon Cytokine Res 2001;21(2):65-73.
18. Lisdawati V. Phaleria macrocarpa, toksisitas, efek anti oksidan, dan efek anti-kanker berdasarkan uji penapisan farmakologi. Jakarta (INA): PT Phaleria macrocarpa; 2002. Available from:  
URL:<http://www.indonetwork.phalerindofarma/34716.htm>.di unduh tgl 14-4 2009
19. Sumastuti R, Sonlimar M. Efek sitotoksik ekstrak buah dan daun Phaleria macrocarpa terhadap sel hela. Yogyakarta: Farmakologi FK UGM; 2003. p. 1-12.
20. Constatinides P. General Pathobiologi. Connecticut: Appleton & Lange; 1994. p. 173 – 90.
21. Dickson RB, Lippman ME. Cancer of the breast. In: Vincent TD, Samuel H, Steven AR. Editors. Principles & practice of oncology. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997. p. 1541-616.
22. Wunderlich J R., Restifo N P. Essentials of immunology. In: Vincent TD, Samuel H, Steven AR. editors. Principles & practice of oncology. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincot and Raven; 1997. p. 47-75.
23. Virginia KL, Colin AP, Raman Q, Edwin DS. Breast cancer. In: Philip R, Sandra M, Raman Q, editors. Clinical oncology. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1993. p. 187-94.
24. Sukardja. Biologi tumor: Onkologi Klinik ed 2. Surabaya : Airlangga University Press ; 2000. p. 65-83.

25. Sarjadi. Karsinoma epidermoid serviks uteri (Beberapa aspek epidemiologi serta peran histopatologi dan petanda tumor dalam penentuan prognosis). Disertasi doktor. Semarang: Universitas Diponegoro; 1985. p. 8-12.
26. Contran RS, Kumar V, Robbins SL. Pathologic basis of disease. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders; 1994. p. 35-9,72-8.
27. Thornthwaite JT. My discovery of the natural killer cell. Available from: URL:<http://www.cancerfoundation.com/NKcells.html>. 2002 di unduh tgl 14-04 2009.
28. Perforin : interferon-gamma contributes independent antitumor effects. Reuters Health Information (2001-01-12)  
Available from URL:  
<http://www.hci.utah.edu/content/reuters/2001/01/12/20010112scie001>.
29. Junqueira LC, Arneiro J, Kelley RO. Basic histology. 8<sup>th</sup> ed. London: Prentice Hall International Inc; 1995. p. 423-46.
30. Ladish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky S, Lawrence, Matsudaira P, Darnell J. Molecular Cell Biology. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Scientific American Books; 1996. p. 886-98,1247-70.
31. Hiroko D, Teruhiko F, Shino N, Toshihiro K, Kazuo S. Analysis of cell growth inhibitory effect of catechin through MAPK in human breast cancer cell line T47D. *Int J Oncol* 2002;21:1301-5.
32. Trapani JA. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biology* 2001,3014.1-7. Available from: URL:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=11790262>
33. 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>? Di unduh tgl 14-04-2009
34. Selamat B, Benny I, Djoko H. Pengaruh ekstrak mahkota dewa terhadap skor ekspresi perforin CTL dan sel-NK serta indeks apoptosis pada adenokarsinoma mamma mencit C3H. *MMI* 2007, p. 8-37, 40-54.
35. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. New York: World Health Organization; 1993. p. 44.
36. Imono AD. Obat tradisional dan fitoterapi (uji toksikologi). Yogyakarta: Universitas Gajah Mada; 1986. p. 3-21.

37. 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.
38. Aihara M, Scardinon PT. The frequency of apoptosis adenocarcinoma of the prostate. J Cancer 1995; 523-9
39. Trapp RG, Beth DS. Basic and clinical biostatistics. 10<sup>th</sup> ed. Connecticut (EN): Appleton & Lange; 1994. p. 124-40,162-82.
40. Santoso S. SPSS (Statistical Product and Service Solution). Jakarta: PT. Elex Media Komputindo; 1999. p. 300-80.
41. Santoso S. SPSS. Statistik Multivariat. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo; 2002. p.208-21.

## LAMPIRAN STATISTIK

### Descriptives

	Kelompok Perlakuan		Statistic	Std. Error	
Ekspresi ganzyme	Kontrol	Mean	2.4420	.3717	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.4101	
			Upper Bound	3.4739	
		5% Trimmed Mean	2.4628		
		Median	2.3600		
		Variance	.691		
		Std. Deviation	.8310		
		Minimum	1.25		
		Maximum	3.26		
		Range	2.01		
		Interquartile Range	1.5350		
		Skewness	-.536	.913	
		Kurtosis	-.649	2.000	
	Perlakuan 1	Mean	16.3280	3.5337	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	6.5168	
			Upper Bound	26.1392	
		5% Trimmed Mean	16.6544		
		Median	20.0600		
		Variance	62.436		
		Std. Deviation	7.9016		
		Minimum	4.24		
		Maximum	22.54		
		Range	18.30		
Interquartile Range		14.0900			
Skewness		-1.111	.913		
Kurtosis		-.123	2.000		
Perlakuan 2	Mean	44.0100	4.3723		
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	31.8706		
		Upper Bound	56.1494		
	5% Trimmed Mean	43.6622			
	Median	40.1600			
	Variance	95.585			
	Std. Deviation	9.7767			
	Minimum	35.64			

		Maximum		58.64	
		Range		23.00	
		Interquartile Range		17.8450	
		Skewness		.978	.913
		Kurtosis		-.491	2.000
	Perlakuan 3	Mean		65.1880	1.4260
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	61.2288	
			Upper Bound	69.1472	
		5% Trimmed Mean		65.2972	
		Median		66.3300	
		Variance		10.167	
		Std. Deviation		3.1886	
		Minimum		60.27	
		Maximum		68.14	
		Range		7.87	
		Interquartile Range		5.6850	
		Skewness		-1.080	.913
		Kurtosis		.315	2.000
post-pre	Kontrol	Mean		1.2720	8.000E-03
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.2498	
			Upper Bound	1.2942	
		5% Trimmed Mean		1.2722	
		Median		1.2700	
		Variance		3.200E-04	
		Std. Deviation		1.789E-02	
		Minimum		1.25	
		Maximum		1.29	
		Range		.04	
		Interquartile Range		3.500E-02	
		Skewness		-.052	.913
		Kurtosis		-2.324	2.000
	Perlakuan 1	Mean		.4240	.1087
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.1223	
			Upper Bound	.7257	
		5% Trimmed Mean		.4261	
		Median		.4500	
		Variance		5.903E-02	
		Std. Deviation		.2430	
		Minimum		.12	
		Maximum		.69	
		Range		.57	

Perlakuan 2	Interquartile Range		.4750		
	Skewness		-.231	.913	
	Kurtosis		-2.200	2.000	
	Mean		.1000	1.140E-02	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		6.834E-02	
		Upper Bound		.1317	
	5% Trimmed Mean		.1000		
	Median		.1000		
	Variance		6.500E-04		
	Std. Deviation		2.550E-02		
	Minimum		.07		
	Maximum		.13		
	Range		.06		
	Interquartile Range		5.000E-02		
	Skewness		.000	.913	
	Kurtosis		-2.260	2.000	
Perlakuan 3	Mean		9.200E-02	3.760E-02	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		-.0124	
		Upper Bound		.1964	
	5% Trimmed Mean		9.111E-02		
	Median		5.000E-02		
	Variance		7.070E-03		
	Std. Deviation		8.408E-02		
	Minimum		.00		
	Maximum		.20		
	Range		.20		
	Interquartile Range		.1550		
	Skewness		.454	.913	
	Kurtosis		-2.116	2.000	

## NPar Tests

### Kruskal-Wallis Test

#### Ranks

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank
post-pre	Kontrol	5	18.00
	Perlakuan 1	5	12.30
	Perlakuan 2	5	6.30
	Perlakuan 3	5	5.40
	Total	20	

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	post-pre
Chi-Square	14.768
df	3
Asymp. Sig.	.002

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

**NPar Tests**

**Mann-Whitney Test**

**Ranks**

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
post-pre	Kontrol	5	8.00	40.00
	Perlakuan 1	5	3.00	15.00
	Total	10		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	post-pre
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.619
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

**NPar Tests**

**Mann-Whitney Test**

**Ranks**

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
post-pre	Kontrol	5	8.00	40.00
	Perlakuan 2	5	3.00	15.00
	Total	10		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	post-pre
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.619
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

## NPar Tests

### Mann-Whitney Test

#### Ranks

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
post-pre	Kontrol	5	8.00	40.00
	Perlakuan 3	5	3.00	15.00
	Total	10		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	post-pre
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.627
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

## NPar Tests

### Mann-Whitney Test

**Ranks**

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
post-pre	Perlakuan 1	5	7.70	38.50
	Perlakuan 2	5	3.30	16.50
	Total	10		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	post-pre
Mann-Whitney U	1.500
Wilcoxon W	16.500
Z	-2.305
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.016 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

**NPar Tests**

**Mann-Whitney Test**

**Ranks**

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
post-pre	Perlakuan 1	5	7.60	38.00
	Perlakuan 3	5	3.40	17.00
	Total	10		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	post-pre
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	17.000
Z	-2.200
Asymp. Sig. (2-tailed)	.028
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.032 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

**NPar Tests**

**Mann-Whitney Test**

### Ranks

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
post-pre	Perlakuan 2	5	6.00	30.00
	Perlakuan 3	5	5.00	25.00
	Total	10		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	post-pre
Mann-Whitney U	10.000
Wilcoxon W	25.000
Z	-.524
Asymp. Sig. (2-tailed)	.600
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.690 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

## NPar Tests

### Kruskal-Wallis Test

#### Ranks

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank
Ekspresi ganzyme	Kontrol	5	3.00
	Perlakuan 1	5	8.00
	Perlakuan 2	5	13.00
	Perlakuan 3	5	18.00
	Total	20	

### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Ekspresi ganzyme
Chi-Square	17.857
df	3
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

## NPar Tests

## Mann-Whitney Test

### Ranks

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ekspresi ganzyme	Kontrol	5	3.00	15.00
	Perlakuan 1	5	8.00	40.00
	Total	10		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	Ekspresi ganzyme
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

## NPar Tests

## Mann-Whitney Test

### Ranks

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ekspresi ganzyme	Kontrol	5	3.00	15.00
	Perlakuan 2	5	8.00	40.00
	Total	10		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	Ekspresi ganzyme
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

## NPar Tests

## Mann-Whitney Test

### Ranks

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ekspresi ganzyme	Kontrol	5	3.00	15.00
	Perlakuan 3	5	8.00	40.00
	Total	10		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	Ekspresi ganzyme
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

## NPar Tests

## Mann-Whitney Test

### Ranks

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ekspresi ganzyme	Perlakuan 1	5	3.00	15.00
	Perlakuan 2	5	8.00	40.00
	Total	10		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	Ekspresi ganzyme
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

## NPar Tests

### Mann-Whitney Test

#### Ranks

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ekspresi ganzyme	Perlakuan 1	5	3.00	15.00
	Perlakuan 3	5	8.00	40.00
	Total	10		

#### Test Statistics<sup>b</sup>

	Ekspresi ganzyme
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

## NPar Tests

### Mann-Whitney Test

#### Ranks

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ekspresi ganzyme	Perlakuan 2	5	3.00	15.00
	Perlakuan 3	5	8.00	40.00
	Total	10		

#### Test Statistics<sup>b</sup>

	Ekspresi ganzyme
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

## LAMPIRAN GAMBAR MENCIT C3H



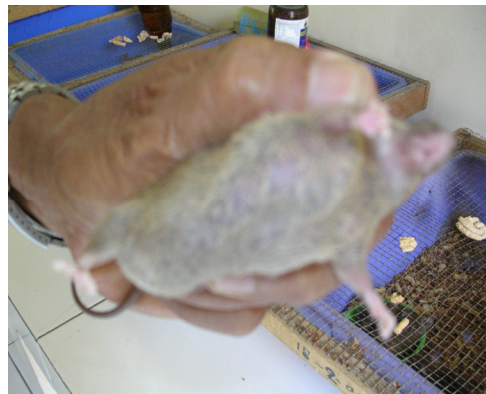
Mencit C3H sebelum perlakuan



Mencit C3H kontrol setelah perlakuan

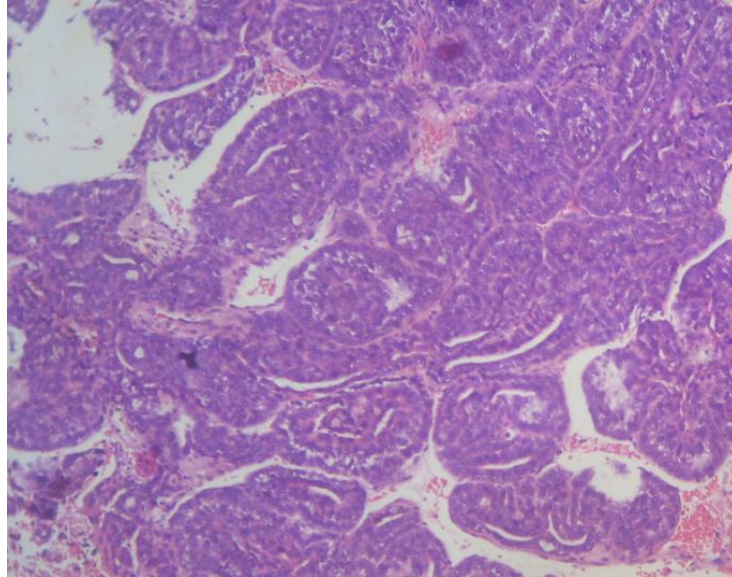


Mencit C3H setelah Inokulasi tumor

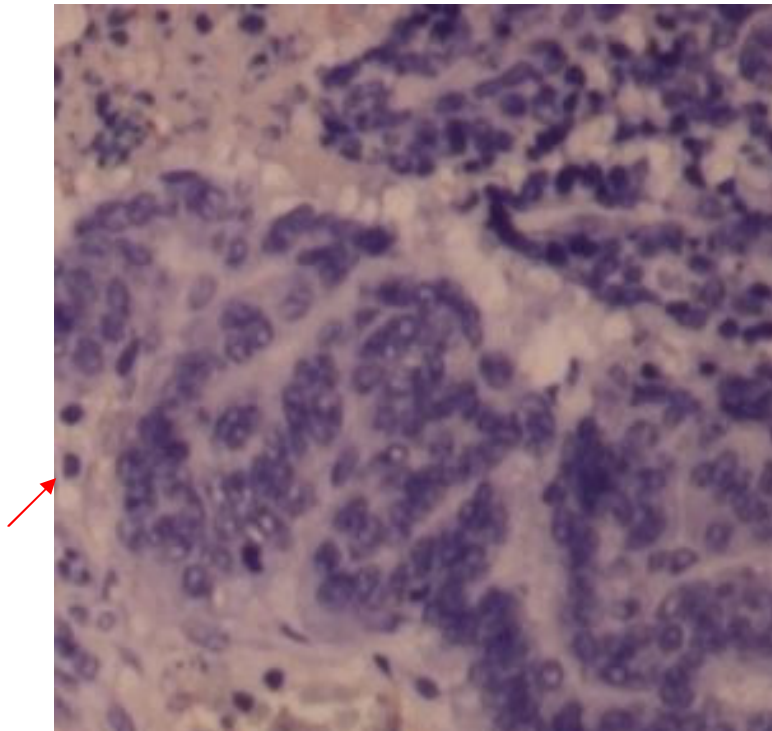


Mencit C3H P1 setelah perlakuan

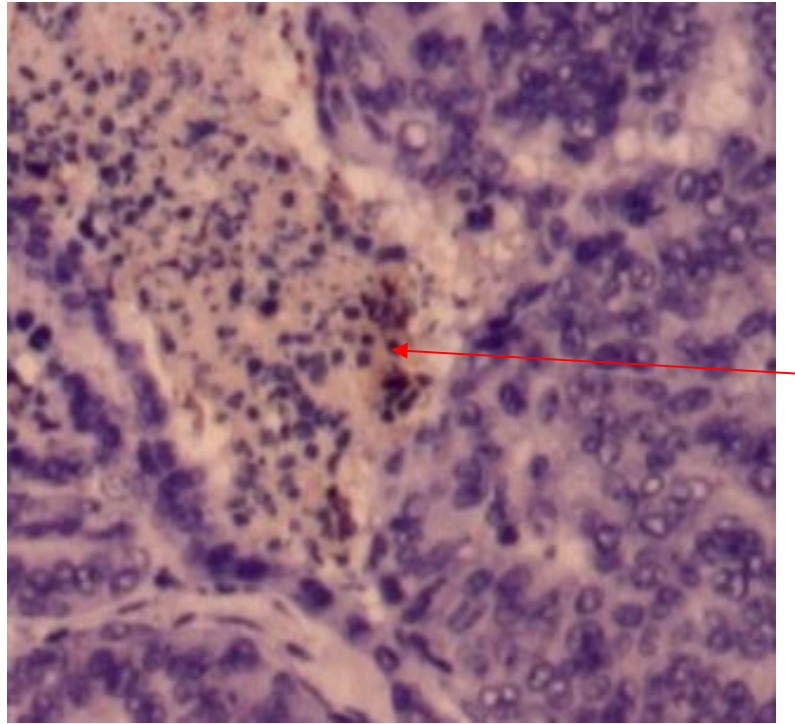
**LAMPIRAN PEMERIKSAAN MIKROSKOPIK MASSA TUMOR**



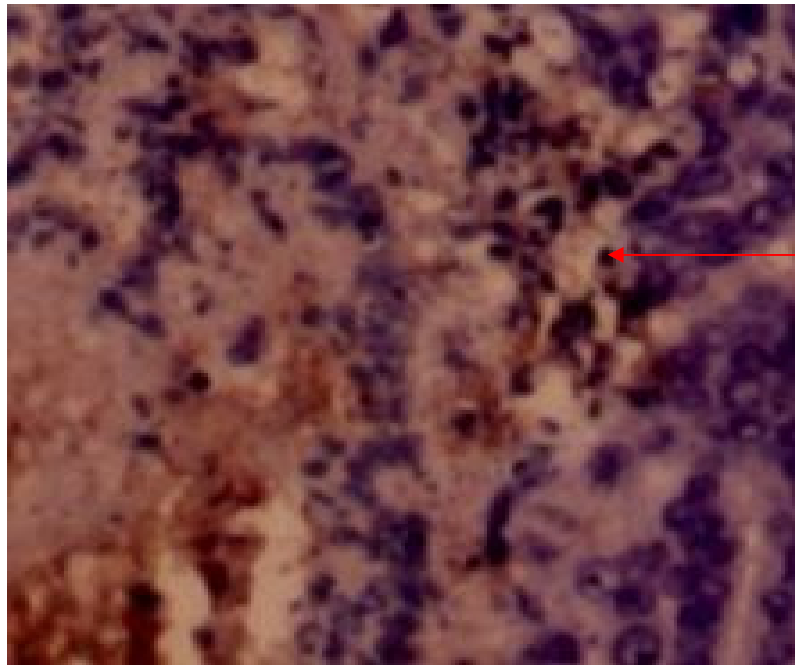
Pewarnaan HE 100x



Ekspresi granzyme kontrol 400x



Ekspresi granzyme P1 400x



Ekspresi Granzyme P3 400x