

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK TEMULAWAK (*Curcuma
xanthorrhiza Roxb*) TERHADAP SEBUKAN SEL MONONUKLEAR
DISEKITAR JARINGAN ADENOKARSINOMA MAMMA
Studi terhadap Mencit C3H yang Diinokulasi Jaringan Tumor**

Karya Tulis Ilmiah

untuk memenuhi sebagian persyaratan
untuk mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Oleh :

Nugroho Akbar

01.207.5406

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG**

2011

Karya Tulis Ilmiah

**PENGARUH EKSTRAK TEMULAWAK (*Curcuma xanthorrhiza Roxb*)
TERHADAP SEBUKAN SEL MONONUKLEAR DISEKITAR JARINGAN
ADENOKARSINOMA MAMMA**

Studi terhadap Mencit C3H yang Diinokulasi Jaringan Tumor

Yang dipersiapkan dan disusun oleh :

Nugroho Akbar

01.207.5406

telah dipertahankan di depan Dewan Penguji

pada tanggal 14 Maret 2011

dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Susunan Tim Penguji

Pembimbing I



dr. H. Sumarno, M.Si Med., Sp. PA

Anggota Tim Penguji



dr. Hj. Chodidjah, M. Kes.

Pembimbing II



Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes



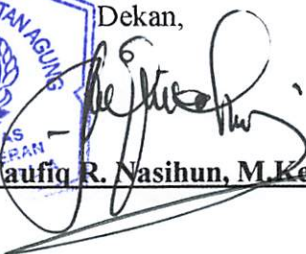
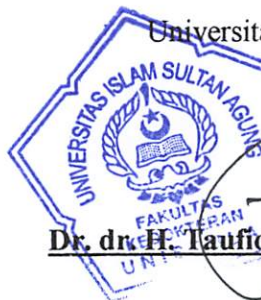
dr. A. Fuadi, Sp. B. KBD., M. Kes

Semarang, Maret 2011

Fakultas Kedokteran

Universitas Islam Sultan Agung

Dekan,



Dr. dr. H. Taufiq R. Nasihun, M.Kes, Sp.And

PRAKATA

Assalamu'alaikum Wr.Wb.

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas semua anugerah dan rahmatNya sehingga Karya Tulis Ilmiah dengan judul **“Pengaruh Ekstrak Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb*) Terhadap Sebukan Sel Mononuklear Disekitar Jaringan Adenokarsinoma Mamma Studi terhadap Mencit C3H yang diinokulasi Jaringan Tumor”** ini dapat terselesaikan.

Karya Tulis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada:

1. Dr. dr. H. Taufiq R Nasihun, M.Kes, Sp.And., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. dr. H. Sumarno, M.Si Med., Sp.PA., dan Ir. Titiek Sumarawati, selaku dosen pembimbing I dan II yang telah dengan sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya Karya Tulis Ilmiah ini.
3. dr. Hj. Chodidjah, M.Kes., dan dr. A. Fuadi, Sp.B.KBD., M.Kes., selaku dosen penguji yang telah dengan sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya Karya Tulis Ilmiah ini.
4. Bapak Slamet Hartanto dan staf Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas

Kedokteran Universitas Indonesia yang telah membantu dalam penelitian ini.

5. Dra. Dewi Kusri, M.Si., dan seluruh staf Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Diponegoro yang telah membantu dalam penelitian ini.

6. Bapak H. Sukono, SE, MBA dan Ibu Hj. Sofiaty, dan kakak serta adik-adik tercinta, penulis menyampaikan rasa terima kasih yang tulus dan ikhlas atas kasih sayang, dukungan serta doa yang tiada henti.

7. Teman angkatan 2007 Reinforcer, sejawat BAI, keluarga asisten laboratorium Patologi Anatomi dan seluruh pihak yang mendukung terselesainya Karya Tulis Ilmiah ini.

Sebagai akhir kata dari penulis, penulis hanya bisa berharap semoga Karya Tulis Ilmiah ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Wassalamu'alaikum Wr.Wb

Semarang, Maret 2011

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman Judul.....	i
Lembar Pengesahan.....	ii
Prakata.....	iii
Daftar Isi.....	v
Daftar Tabel.....	viii
Daftar Singkatan.....	ix
Daftar Lampiran.....	x
Intisari.....	xi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Kanker Payudara.....	6
2.1.1. Definisi Tumor.....	6
2.1.2. Anatomi Payudara.....	7
2.1.3. Faktor Resiko Kanker Payudara.....	8
2.1.4. Klasifikasi Kanker Payudara.....	9

2.1.5. Morfologi Kanker Payudara.....	10
2.2. Temulawak (<i>Curcuma xanthorrhiza Roxb</i>)	
2.2.1. Taksonomi.....	12
2.2.2. Morfologi.....	12
2.2.3. Khasiat.....	14
2.2.4. Kandungan Kimia.....	15
2.2.5. Efek Farmakologis.....	17
2.2.6. Pengaruh Kurkumin terhadap Sebukan Sel Mononuklear	19
2.3. Immunologi Tumor	
2.3.1. Peran Sistem Imun.....	21
2.3.2. Konsep <i>Immunosurveillance</i>	22
2.3.3. Respon Imun terhadap Tumor.....	24
2.3.4. <i>Immunological escape</i>	29
2.4. Kerangka Teori	33
2.5. Kerangka Konsep.....	34
2.6. Hipotesis.....	34

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	35
3.2. Variabel dan Definisi Operasional.....	35
3.3. Populasi dan Sampel.....	37
3.4. Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	38

3.5. Instrumen dan Bahan Penelitian.....	38
3.6. Cara Penelitian.....	40
3.7. Tempat dan Waktu Penelitian.....	48
3.8. Analisa Hasil.....	49
3.9. Alur Kerja.....	50
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
4.1. Hasil Penelitian.....	51
4.2. Pembahasan.....	54
BAB V SIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Simpulan.....	59
5.2. Saran.....	59
DAFTAR PUSTAKA.....	60
LAMPIRAN	



DAFTAR TABEL

Tabel 1. Hasil Pembacaan Histopatologi Sebukan Sel Mononuklear Disekitar Jaringan Adenokarsinoma Mamma pada Masing-Masing Kelompok..	52
Tabel 2. Data sebukan sel mononuklear pada tiap kelompok uji.....	53
Tabel 3. Hasil Uji <i>Mann-Whitney</i>	54



DAFTAR SINGKATAN



ADCC	: <i>Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity</i>
APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
BCG	: <i>Bacille Calmette Guerin</i>
COX-2	: <i>Cixlooksigenase-2</i>
DAG	: <i>Diasil Gliserol</i>
HE	: <i>Hematoksilin Eosin</i>
ICAM	: <i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IFN	: <i>Interferon</i>
Ig	: <i>Imunoglobulin</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IP3	: <i>Inositol Trifosfat</i>
LAK	: <i>Lymphocyte Activated Killer</i>
LGL	: <i>Large Granulocytic Lymphocyte</i>
LT	: <i>Limfotoksin</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
NK	: <i>Natural Killer (cell)</i>
TAA	: <i>Tumor Associated Antigen</i>
Th	: <i>T helper</i>
Tc	: <i>T cytotoxic</i>
PMN	: <i>Polimorfonuklear</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Penelitian Gambaran Histopatologi Sebukan Sel Mononuklear
Disekitar Jaringan Adenokarsinoma Mamma

Lampiran 2. Uji Normalitas dan Homogenitas

Lampiran 3. Uji *Kruskall-Wallis*

Lampiran 4. Uji *Mann-Whitney*

Lampiran 5. Hasil statistik deskriptif rerata sebukan sel mononuklear disekitar
jaringan adenokarsinoma mamma

Lampiran 6. Gambar-Gambar Penelitian

Lampiran 7. Surat Keterangan Penelitian dari Laboratorium Kimia Organik
FMIPA UNDIP

Lampiran 8. Surat Keterangan Penelitian dari Departemen Patologi Anatomi FK
UI

Lampiran 9. Surat Keterangan Penelitian dari Laboratorium Patologi Anatomi FK
UNISSULA

INTISARI

Pengobatan kemoterapi umumnya hanya menyerang sel-sel yang berproliferasi, sehingga banyak sel kanker yang tidak membelah menjadi resisten terhadap kemoterapi. Disamping itu obat kemoterapi yang digunakan banyak menimbulkan reaksi-reaksi yang tidak diinginkan, sehingga banyak pasien kanker yang beralih kepengobatan tradisional. Ekstrak temulawak sebagai terapi alternatif mengandung kurkumin yang dapat meningkatkan respon sel limfosit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak temulawak terhadap sebukan sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma pada mencit C3H.

Penelitian eksperimental dengan rancangan *randomized post test only control group design*. Besar sampel penelitian 24 ekor mencit C3H yang telah tumbuh tumor, kemudian dibagi dalam 4 kelompok secara acak dimana tiap kelompok terdiri dari 6 ekor. Kelompok K hanya diberikan pakan standar, sedangkan PI, PII dan PIII diberi pakan standar dan ekstrak temulawak dengan dosis 0,82 mg/hari, 1,64 mg/hari, dan 3,28 mg/hari selama 21 hari. Pada hari ke 22 dilakukan terminasi dan pembuatan sediaan histopatologi. Analisa data dilakukan dengan uji *Kruskall-Wallis*, kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.

Rerata sebukan sel mononuklear tertinggi pada kelompok PII 1,60, kelompok PIII 1,23, kelompok PI 1,13 dan terendah pada kelompok K 0,56. Pada uji *Kruskall-Wallis* didapatkan hasil $p < 0,05$. Hasil uji *Post-Hoc Mann Whitney* $p < 0,05$ pada K-PI, K-II, K-PIII, PI-PII, PII-PIII dan pada PI-PIII didapatkan $p > 0,05$

Pemberian ekstrak temulawak berpengaruh terhadap peningkatkan sebukan sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma pada mencit C3H.

Kata Kunci : Temulawak, sebukan sel mononuklear, adenokarsinoma mamma.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Menurut laporan dari *American Cancer Society* (2009), angka insiden dan kematian akibat kanker payudara tiap tahunnya semakin meningkat. Perkiraan kasus baru kanker payudara mencapai 192.370 kasus pada wanita, sedangkan jumlah kematian yang disebabkan kanker payudara mencapai 40.170 di Amerika Serikat. Banyak penderita kanker payudara sekarang ini beralih ke pengobatan tradisional, selain murah penggunaan obat tradisional secara umum dinilai lebih aman dari pada penggunaan obat modern (Riyasa dan Notosiswoyo, 2004). Hal ini disebabkan karena obat tradisional memiliki efek samping yang relatif lebih sedikit dari pada obat modern (Kintoko, 2006). Obat kemoterapi yang digunakan biasanya banyak menimbulkan reaksi-reaksi yang tidak diinginkan, seperti toksisitas jantung, alopesia, disfungsi gagal ginjal, disfungsi saraf akustik, mual dan muntah (Katzung, 2004). Sehingga pasien harus mengeluarkan dana tambahan yang besar untuk mengobati efek samping yang timbul (Hassett dkk, 2006). Pengobatan kanker dengan agen kemoterapi konvensional umumnya tidak selalu berhasil terutama pada tumor padat karena target dari agen kemoterapi konvensional hanya pada sel-sel yang berproliferasi. Selain itu, semakin besar ukuran tumor semakin menurun fraksi sel yang mengalami proliferasi,

akibatnya banyak sel kanker yang tidak membelah menjadi resisten terhadap kemoterapi (Katzung, 2004).

Berdasarkan laporan dari *American Cancer Society* di Amerika Serikat selama 2002-2006, 95% kasus baru dan 97% kematian yang disebabkan kanker payudara terjadi pada wanita yang berusia 40 tahun atau lebih. Umur rata-rata diagnosis kanker payudara adalah 61 tahun, hal ini menunjukkan 50% wanita yang terdiagnosis kanker payudara saat umur 61 tahun atau lebih muda. Berdasarkan profil kesehatan Indonesia tahun 2007, jumlah kasus penyakit kanker yang tertinggi di Indonesia selama tahun 2004-2006 adalah kanker payudara diikuti dengan kanker leher rahim, insiden kanker payudara selama tiga tahun tersebut terus meningkat. Berdasarkan profil kesehatan Jawa Tengah tahun 2008, prevalensi kasus kanker payudara di Jawa Tengah juga mengalami peningkatan dari 0,02% pada tahun 2005 menjadi 0,04% pada tahun 2006. Pada tahun 2007 tetap sebesar 0,04%, kemudian meningkat lagi pada tahun 2008 menjadi 0,05%. Prevalensi tertinggi adalah di kota Surakarta sebesar 0,28% (Profil Kesehatan Jawa Tengah, 2010).

Proses timbulnya kanker terjadi melalui beberapa tingkat, yakni fase inisiasi, promosi, dan progresi (Robbins dan Cotran, 2008). Sel kanker sendiri mengandung petanda tumor pada membran selnya sehingga dikenal sebagai benda asing oleh sistem imun tubuh, yang melibatkan komponen imun seluler maupun humoral (Halim dan Sahil, 2001). Pada daerah tepi tumor yang invasif, stroma disekitarnya sering terdapat sekumpulan sel

mononuklear yang terdiri atas infiltrat limfosit (sel T, sel B dan sel NK) dan makrofag (Underwood, 2000). Temulawak merupakan salah satu bahan alam yang berkhasiat sebagai terapi alternatif pada jenis tumor tertentu. Hal ini didasarkan pada kurkumin yang terkandung dalam temulawak yang memiliki efek antioksidan, dimana dapat menghambat proliferasi sel-sel tumor dari kanker usus besar dan payudara (Tjay dan Rahardja, 2007). Kurkumin memiliki kemampuan meningkatkan efek terhadap fungsi utama dari sel T, sel *natural killer* (NK), *macrophages*, dan *splenocytes* total *in vivo*. Selain itu berdasarkan penelitian Varalakshmi dkk (2008) ditemukan peningkatan kemampuan proliferasi sel limfosit yang diamati pada hewan perlakuan yang diinjeksi kurkumin. Kurkumin merupakan satu komponen kurkuminoid mempunyai kemampuan menekan proliferasi berbagai sel tumor melalui efeknya pada siklus sel dan menginduksi apoptosis pada berbagai sel tumor melalui mekanisme yang tergantung mitokondria maupun yang tidak tergantung mitokondria. Kurkumin juga dapat menghambat faktor angiogenesis sehingga dapat mempengaruhi pertumbuhan massa tumor (Aggarwal dkk, 2003).

Beberapa penelitian mengenai temulawak diantaranya oleh Mardiawan (2006) mengenai pengaruh pemberian ekstrak temulawak terhadap ukuran tumor dan gambaran histologi paru dan kelenjar limfe aksilla pada mencit C3H yang telah diinokulasi sel adenokarsinoma mamma. Penelitian lain oleh Naziya (2006) yakni tentang pengaruh pemberian ekstrak temulawak terhadap gambaran histopatologi kelenjar payudara pada mencit C3H yang

telah diinokulasi adenokarsinoma mamma. Pada penelitian ini peneliti ingin mengetahui pengaruh yang ditimbulkan oleh pemberian ekstrak temulawak terhadap jumlah sebukan sel mononuklear yang terdiri dari infiltrat limfosit (sel T, sel B dan sel NK) dan makrofag disekitar jaringan adenokarsinoma mamma. Berdasarkan alasan tersebut, penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak temulawak berbagai dosis terhadap sebukan sel mononuklear di sekitar jaringan adenokarsinoma mamma pada mencit C3H yang telah diinokulasi jaringan tumor.

1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah di atas, dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut:

“Apakah ada pengaruh pemberian ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb*) terhadap jumlah sebukan sel mononuklear di sekitar jaringan adenokarsinoma mamma pada mencit C3H yang telah diinokulasi jaringan tumor?”

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Mengamati sebukan sel mononuklear di sekitar jaringan adenokarsinoma mamma pada mencit C3H yang telah diinokulasi jaringan tumor antara kelompok yang diberi ekstrak temulawak

(*Curcuma xanthorrhiza Roxb*) dengan kelompok yang tidak diberi ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb*).

1.3.2. Tujuan Khusus

Mengamati pengaruh berbagai dosis ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb*) terhadap sebulan sel mononuklear di sekitar jaringan adenokarsinoma mamma pada mencit C3H yang telah diinokulasi jaringan tumor.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

1.4.1.1. Memberikan informasi mengenai pengaruh pemberian ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb*) terhadap sebulan sel mononuklear di sekitar jaringan adenokarsinoma mamma pada mencit C3H yang telah diinokulasi jaringan tumor pada berbagai dosis.

1.4.1.2. Sebagai sumber acuan untuk penelitian selanjutnya.

1.4.2. Manfaat Praktis

Memberikan informasi mengenai kegunaan temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb*) sebagai salah satu alternatif terapi kanker payudara.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kanker Payudara

2.1.1. Definisi Tumor

Neoplasma atau tumor merupakan lesi yang terjadi akibat pertumbuhan abnormal sel, yang replikasinya tidak dapat dikendalikan oleh mekanisme yang bekerja pada jaringan normal (Damjanov, 2000). Secara harfiah neoplasma berarti pertumbuhan baru. Hal mendasar tentang asal neoplasma adalah hilangnya responsivitas terhadap faktor pengendali pertumbuhan yang normal (Robbins dkk, 2007). Sel neoplasma adalah sel tubuh itu sendiri yang mengalami mutasi dan transformasi bentuk dan sifatnya, yang berakibat pertumbuhannya menjadi autonom dan tak terkendali. Mutasi dan transformasi ini terjadi karena kerusakan gen yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi, dimana kerusakan yang terjadi ini dapat ringan sampai berat dan luas. Bila kerusakannya ringan akan terbentuk sel/jaringan neoplasma jinak dan bila berat dan luas akan terbentuk sel/jaringan neoplasma ganas yang lebih akrab dikenal sebagai kanker. Tumor ganas (maligna) ini melekat erat ke semua permukaan yang dipijaknya, lesi dapat menyerbu dan merusak struktur didekatnya dan menyebar ketempat jauh (metastasis) serta dapat menyebabkan kematian (Robbins dkk, 2007).

Proses timbulnya kanker terjadi melalui beberapa tingkat yaitu:

1) Fase inisiasi: DNA dirusak akibat radiasi/ zat karsinogen (radikal bebas). Zat-zat inisiator ini mengganggu proses reparasi normal, sehingga terjadi mutasi DNA dengan kelainan pada kromosomnya. Perubahan DNA yang tidak diperbaiki merupakan langkah pertama yang esensial untuk menimbulkan tumor. 2) Fase promosi: kejadian mutagenik awal pada sebagian besar kasus memerlukan pajanan berikutnya dengan promoter, yang meliputi berbagai hormon, obat, fenol, dan ester forbol. Promoter terlibat dalam ekspansi kolonal dan penyimpanan diferensiasi sel-sel yang sudah mengalami inisiasi. 3) Fase progresi: gen-gen pertumbuhan yang diaktivasi oleh kerusakan DNA mengakibatkan mitosis dipercepat dan pertumbuhan liar dari sel-sel ganas, tumor menjadi manifest (Robbins dan Cotran, 2008).

2.1.2. Anatomi Payudara

Payudara merupakan kelenjar kulit khusus yang terdiri atas lemak, kelenjar, dan jaringan ikat. Payudara terletak setinggi kostal ke-2 sampai ke-6 dan menutupi kartilago kostal di anterior dan dari batas lateral sternum ke garis mid-aksilaris. Posisi puting bervariasi pada wanita namun pada pria biasanya setinggi rongga interkostal ke-4 di garis midklavikularis. Sebagian payudara yang disebut kauda aksilaris, merentang ke arah lateral melalui fasia profunda di bawah m. pectoralis untuk memasuki aksila. Tiap payudara terdiri atas 15-30 unit dukto-lobular fungsional yang tersusun radial di sekitar

puting susu. Lobus-lobus ini dipisahkan oleh septa fibrosa (ligamentum suspensorium) yang berjalan dari fascia profunda menuju kulit di atasnya sehingga memberikan struktur pada payudara. Duktus laktiferus keluar dari tiap lobus dan menyatu pada puting. Pada bagian terminal duktus melebar (sinus laktiferus) dan kemudian terus ke puting susu di mana air susu dikeluarkan. Areola adalah daerah gelap di sekitar puting susu. Permukaannya biasanya ireguler akibat banyaknya tuberkel-tuberkel kecil kelenjar Montgomery (Faiz dan Moffat, 2005).

2.1.3. Faktor Resiko Kanker Payudara

Insidens kanker payudara semakin meningkat sejak usia 30 tahun. Kanker ini jarang sekali ditemukan pada wanita usia dibawah 20 tahun. Angka tertinggi terdapat pada usia 45-66 tahun. Insidens karsinoma mamma pada lelaki hanya 1% dari kejadian pada perempuan (Sjamsuhidajat dan de Jong, 2004). Seperti kanker lainnya, penyebab kanker payudara masih belum diketahui. Adapun Faktor resiko kanker payudara yang telah diidentifikasi adalah (Robbins dkk, 2007):

A. Pengaruh yang sudah dipastikan

1. Faktor geografik: bervariasi di tempat yang berbeda.
2. Usia: meningkat setelah usia 30 tahun.
3. Riwayat keluarga yang mengidap kanker payudara.

4. Riwayat haid: usia menarke <12 tahun ,dan usia menopause >55 tahun.
5. Kehamilan: kelahiran pertama setelah usia 35 tahun.
6. Wanita belum pernah melahirkan dan menyusui (nullipara).
7. Terdapat tumor payudara jinak sebelumnya, penyakit proliferasif, penyakit proliferasif dengan hiperplasia atipikal, dan karsinoma lobularis in situ.

B. Pengaruh yang belum dipastikan

1. Estrogen eksogen
2. Kontrasepsi oral
3. Kegemukan
4. Diet tinggi lemak
5. Konsumsi alkohol
6. Merokok

2.1.4. Klasifikasi Kanker Payudara

Menurut *American Joint Committee on Cancer Staging in*

Breast Carcinoma, klasifikasi kanker payudara adalah (Robbins dkk, 2007):

Stadium 0 : Karsinoma duktus in situ (DCIS) (termasuk penyakit Paget pada puting payudara) dan karsinoma lobulus in situ (LCIS).

Stadium I : Karsinoma invasif dengan ukuran 2 cm atau kurang serta kelenjar getah bening negatif.

Stadium IIA : Karsinoma invasif dengan ukuran 2 cm atau kurang disertai metastasis ke kelenjar kelenjar getah bening atau karsinoma invasif lebih dari 2 cm, tetapi kurang dari 5 cm dengan kelenjar getah bening negatif.

Stadium IIB : Karsinoma invasif berukuran garis tengah lebih dari 2 cm, tetapi kurang dari 5 cm dengan kelenjar kelenjar getah bening positif atau karsinoma invasif berukuran lebih dari 5 cm tanpa keterlibatan kelenjar getah bening.

Stadium IIIA : Karsinoma invasif ukuran berapa pun dengan kelenjar getah bening terfiksasi (yaitu invasi ektranodus yang meluas diantara kelenjar getah bening atau menginvasi ke dalam struktur lain) atau karsinoma berukuran garis tengah 5 cm dengan metastasis kelenjar getah bening nonfiksasi.

Stadium IIIB : Karsinoma inflamasi, karsinoma yang menginvasi dinding dada, karsinoma yang menginvasi kulit, karsinoma dengan nodus kulit satelit, atau setiap karsinoma dengan metastasis ke kelenjar kelenjar getah bening mamaria interna ipsilateral.

Stadium IV : Metastasis ke tempat jauh.

2.1.5. Morfologi Kanker Payudara

Dalam patogenesis kanker payudara diperkirakan terdapat tiga faktor penting yang berperan di dalamnya, yakni:

1. Perubahan genetik: seperti pada sebagian besar kanker lainnya, mutasi yang mempengaruhi protoonkogen dan gen penekan

tumor di epitel payudara ikut serta dalam proses transformasi onkogenik. Diantara berbagai mutasi tersebut ialah ekspresi berlebihan protoonkogen ERBB2 (HER2/NEU), amplikasi gen RAS & MYC, serta mutasi gen penekan tumor RB1 & TP53.

2. Pengaruh hormon: estrogen merangsang pembentukan faktor pertumbuhan oleh sel epitel payudara normal dan oleh sel kanker. Dihipotesiskan bahwa reseptor estrogen dan progesteron yang secara normal terdapat diepitel payudara, mungkin berinteraksi dengan promotor pertumbuhan, seperti *transforming growth factor a* (berkaitan dengan faktor pertumbuhan epitel), *platelet-derived growth-factor*, dan faktor pertumbuhan fibroblast yang dikeluarkan oleh sel kanker payudara, untuk menciptakan suatu mekanisme autokrin perkembangan tumor.
3. Faktor lingkungan.
Perkembangan kanker payudara ini menyebabkan terbentuknya gambaran morfologi lokal tertentu. Gambaran ini mencakup kecenderungan untuk melekat ke otot pektoralis atau fascia dalam di dinding dada sehingga terjadi fiksasi lesi, serta melekat ke kulit di atasnya, yang menyebabkan retraksi dan cekungan kulit atau puting payudara. Yang terakhir adalah tanda penting, karena mungkin merupakan indikasi awal adanya lesi, yang dilihat sendiri oleh pasien saat melakukan pemeriksaan tubuh sendiri. Keterlibatan jalur limfatik dapat menyebabkan limfadema lokal.

Pada kasus ini, kulit mengalami penebalan di sekitar folikel rambut, suatu keadaan yang dikenal sebagai peau d'orange (“kulit jeruk”) (Robbins dkk, 2007).

2.2. Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb*)

2.2.1. Taksonomi

Menurut Rukmana (2006), temulawak diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae (tumbuh-tumbuhan)
Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledonae
Ordo	: Zingiberales
Famili	: Zingiberaceae
Genus	: <i>Curcuma</i>
Spesies	: <i>Curcuma xanthorrhiza Roxb</i>

2.2.2. Morfologi

Secara alami temulawak tumbuh dengan baik di lahan-lahan yang teduh dan terlindung dari terik sinar matahari. Temulawak juga dapat tumbuh ditempat yang terik, seperti di tanah tegalan. Tanaman ini memiliki daya adaptasi yang tinggi terhadap berbagai cuaca di daerah beriklim tropis. Tanaman temulawak dapat tumbuh di dataran

rendah dan dataran tinggi, sampai ketinggian 1.500 m dari permukaan laut (dpl) (Afifah dan Tim Lentera, 2005).

Temulawak merupakan tanaman tahunan, berbatang semu, berwarna hijau dan coklat gelap. Tanaman ini tumbuh merumpun dengan batang semu yang tumbuh dari rimpangnya. Batang semu berasal dari pelepah-pelepah daun yang saling menutup membentuk batang. Tinggi tanaman ini dapat mencapai 2 m (Said, 2006).

Tiap tanaman berdaun 2-9 helai, berbentuk bulat memanjang atau lanset, panjang 31-84 cm, lebar 10-18 cm. Telapak daunnya berwarna hijau tua, bergaris-garis coklat lebarnya antara 1-2,5 cm. Berbintik-bintik jernih hijau muda. Pada sisi kiri dan kanan ibu tulang daun terdapat semacam pita memanjang berwarna merah keunguan. Punggung daunnya berwarna pudar dan mengkilat (Afifah dan Tim Lentera, 2005).

Jenis perbungaan tanaman ini termasuk tipe exantha, yaitu jenis temu yang bunganya keluar langsung dari rimpang yang panjangnya mencapai 40-60 cm. Bunganya majemuk berbentuk bulir, bulat panjang, panjang 9-23 cm, lebar 4-6 cm. Bunga muncul secara bergiliran dari kantong-kantong daun pelindung yang besar dan beraneka ragam dalam warna dan ukurannya. Mahkota bunga berwarna merah. Bunga mekar pada pagi hari dan berangsur angsur layu pada sore hari. Sejauh ini, temulawak belum pernah dilaporkan menghasilkan buah atau biji (Said, 2006)

Sebagai tanaman monokotil, temulawak tidak memiliki akar tunggang. Akar yang dipunyai adalah rimpang. Rimpang ialah bagian batang yang terletak di bawah tanah. Rimpang disebut juga umbi akar atau umbi batang. Rimpang temulawak termasuk paling besar diantara semua rimpang marga *Curcuma*. Rimpang temulawak terdiri atas rimpang induk dan rimpang anakan (cabang). Rimpang induknya berbentuk bulat seperti telur dan berwarna kuning tua atau cokelat kemerahan. Bagian dalamnya berwarna jingga kecoklatan. Dari rimpang induk ini, keluar rimpang kedua yang lebih kecil. Arah pertumbuhannya kesamping, berwarna lebih muda dengan bentuk bermacam-macam, dan jumlahnya sekitar 3-7 buah. Jika di biarkan tumbuh lebih dari satu tahun, akan tumbuh banyak rimpang lagi. Ujung rimpang cabang membengkak menjadi umbi kecil. Rimpang ini baunya harum dan rasanya pahit agak pedas (Said, 2006).

2.2.3. Khasiat

Curcuma xanthorrhiza Roxb dapat digunakan sebagai bahan obat utama (*remedium cardinal*), bahan obat penunjang (*remedium adjuvans*), pemberi warna (*corrigenia coloris*) maupun sebagai penambah aroma (*corrigenia odoris*). Secara empiris, temulawak digunakan sebagai obat dalam bentuk tunggal maupun campuran. Berdasarkan hasil penelitian, kurkumin mempunyai aktivitas antitumor yang tinggi, sifatnya tergantung besarnya dosis yang digunakan. Bagian yang digunakan adalah rimpang temulawak.

Selain itu rimpang temulawak berkhasiat sebagai antiradang, anti sembelit, tonikum, dan diuretik. Khasiat temulawak sebagai antiradang diperoleh dari kandungan kurkuminoidnya (Adi, 2007).

Temulawak juga berkhasiat sebagai terapi alternatif pada jenis tumor tertentu. Hal ini didasarkan pada kurkumin yang terkandung dalam temulawak yang memiliki efek antioksidan, dimana dapat menghambat proliferasi sel-sel tumor dari kanker usus besar dan payudara (Tjay dan Rahardja, 2007).

2.2.4. Kandungan Kimia

Temulawak mempunyai komponen aktif sebagai berikut:

2.2.4.1. Minyak Atsiri

Minyak atsiri temulawak mempunyai khasiat sebagai kolagoga (peluruh empedu). Minyak ini digunakan sebagai campuran obat rematik. Minyak temulawak mengandung beberapa zat, yakni seskuiterpen, *acurcumene*, 1-sikloisoprenmyrcene, zingiberin, xanthorrhizol, turunan lisabolen, epolisid-bisakuron, bisakuron A, bisakuron B, bisakuron C, ketonseskuiterpen, turmeron, a-turmeron, a-atlantion, germakron, monoterpen, sineol, d-borneol, d-aphellandrene, dan d-camphene (Afifah dan Tim Lentera, 2005).

2.2.4.2. Kurkuminoid

Pada temulawak diketahui mengandung senyawa kurkuminoid yang memberi warna kuning pada rimpang memiliki kemampuan antibakteri, antikanker, antiradang, dan antioksidan. Kandungan kurkuminoid pada rimpang temulawak sekitar 2,1% yang terdiri dari kurkumin (1,43%), demetoksikurkumin (0,86%), dan bisdemetoksikurkumin (0,12%) (Lin dan Shiau, 2001).

Secara umum absorpsi kurkumin melalui mukosa intestinal kurang, karena kurkumin dimetabolisme secara cepat dalam mukosa intestinal sehingga keberadaannya dalam plasma rendah. Absorpsi kurkumin setelah pemberian peroral sangat bervariasi dari 20-60%, sebagian besar dimetabolisme di mukosa intestinal dan hepar (Ulbricht dan Seamon, 2010). Pada pemberian peroral kurkumin akan direduksi menjadi dihidrokurkumin, tetrahidrokurkumin, dan heksahidrokurkumin terutama pada intestinal. Selanjutnya produk metabolit kurkumin ini diubah menjadi konjugat monoglukuronid oleh enzim β -glukuronidase meliputi kurkumin glukuronoside, dihidrokurkumin glukuronoside, tetrahidrokurkumin glukuronoside, dan heksahidrokurkumin glukuronoside, proses konjugasi ini juga terjadi terutama pada mukosa intestinal. Aktivitas antikanker produk metabolit kurkumin

tidak lebih baik dibandingkan prekursornya yakni kurkumin (Lin dan Shiau, 2001).

Berdasarkan penelitian Ireson dkk (2002) dimana menyelidiki produk metabolit kurkumin dalam fraksi subselular jaringan intestinal pada manusia dan tikus dibandingkan dengan metabolismenya dalam fraksi hepar pada manusia dan tikus. Kurkumin glukuronoside ditemukan dalam mikrosom jaringan intestinal dan hepar, sedangkan metabolit yang lain seperti kurkumin sulfat, tetrahidrokurkumin, dan heksahidrokurkumin ditemukan dalam sitosol jaringan intestinal dan hepar pada manusia dan tikus. Proses konjugasi kurkumin paling besar terjadi pada fraksi jaringan intestinal manusia, sedangkan konjugasi kurkumin pada fraksi hepar manusia lebih rendah. Kemampuan reduksi kurkumin baik pada sitosol jaringan intestinal maupun hepar manusia jauh melebihi kemampuan reduksi pada jaringan intestinal dan hepar tikus masing-masing oleh faktor 18 dan 5.

2.2.5. Efek Farmakologis

2.2.5.1. Efek Antikanker

Penelitian oleh Dr. Conney dan rekan dari *Rutgers University* menunjukkan bahwa kurkumin memiliki efek antikarsinogen yang kuat pada beberapa jaringan, seperti

kulit, perut, usus halus, payudara, dan usus besar. Hambatan induksi kanker yang disebabkan oleh berbagai agen penyebab kanker tampaknya dihubungkan dengan kemampuan kurkumin menghambat enzim detoksifikasi tertentu dan mempertinggi beberapa reaksi fase II seperti GST, kuinon, reduktase, dan glukuronidase. Disamping itu, efek indikator dari kurkumin terhadap Cox-2 dan nitrat oksida dan efek perangsangnya pada perbaikan DNA pada kerusakan karsinogen tampaknya dikaitkan dengan efek antimutagennya (Pangkalan Ide, 2008).

Sebuah *clinical trial* untuk menguji kemanjuran kurkumin sebagai agen kemopreventif pada pasien yang berisiko tinggi dengan lesi prakanker, menunjukkan bahwa pada pemberian ekstrak *Curcuma* secara oral dengan dosis awal 500 mg/hari dan ditingkatkan secara bertahap hingga 8.000 mg/hari selama 3 bulan tidak dilaporkan adanya toksisitas pada manusia. Dalam *clinical trial* yang lain, pasien dengan kanker kolorektal diberikan 440-2200 mg/hari ekstrak *Curcuma* yang mengandung sekitar 36-180 mg kurkumin untuk 4 bulan, dilaporkan ekstrak *Curcuma* dapat ditoleransi dengan baik dan tidak ada toksisitas yang ditemukan (Aggrawal dkk, 2003). Praklinis dan studi klinis dengan kurkumin dalam hubungannya dengan potensi

antikanker telah ditinjau. Uji klinis pada manusia tidak menunjukkan toksisitas dosis, membatasi hingga 10 g/hari secara oral. Studi yang dilakukan sejauh ini menunjukkan bahwa kurkumin mempunyai potensi dalam pencegahan dan terapi kanker (Aggarwal dkk, 2003, Sharma dkk, 2005).

2.2.5.2. Efek Anti-Inflamasi

Kandungan kurkumin dalam temulawak memiliki kemampuan untuk menghambat enzim yang penting dalam proses inflamasi, seperti Cox-2 dan sintase nitrat oksida. Cox-2 adalah enzim kritis tidak hanya dalam inflamasi tapi juga pada banyak tipe kanker (Pangkalan Ide, 2008). Disamping itu temulawak memiliki kandungan germakron yang berkhasiat sebagai anti inflamasi dan menghambat oedema. Tumeron yang memiliki efek anti mikroba (antibiotik), dan P-toluilmetilkarbinol & seskuiterpen d-kamper yang memiliki efek sebagai hepatoprotektor dimana meningkatkan produksi & sekresi empedu (Afifah dan Tim Lentera, 2006).

2.2.6. Pengaruh Kurkumin terhadap Sebukan Sel Mononuklear

Pada daerah tepi tumor yang invasif, stroma disekitarnya sering terdapat sebukan sel mononuklear yang terdiri atas infiltrat limfosit (sel T, sel B dan sel NK) dan makrofag (Underwood, 2000).

Kandungan kurkumin dalam temulawak memiliki efek dalam meningkatkan respon limfosit, yaitu memicu sel limfosit B dan sel limfosit T yang selanjutnya meningkatkan respon imun seluler dan humoral sehingga progresifitas sel-sel tumor dapat ditekan (Mardiawan, 2006). Kurkumin dapat meningkatkan efek terhadap fungsi utama dari sel T, sel *natural killer* (NK), *macrophages*, dan *splenocytes total in vivo* (Shao dkk, 2002). Selain itu berdasarkan penelitian Varalakshmi dkk (2008) ditemukan peningkatan kemampuan proliferasi sel limfosit yang diamati pada hewan perlakuan yang diinjeksi kurkumin.

Mekanisme umum terjadinya proses proliferasi dapat diduga berdasarkan terikatnya senyawa kurkumin pada reseptor permukaan sel T dan sel B. Pengikatan antigen pada reseptor permukaan sel T bersama interleukin 1 (IL-1) dari APC (*Antigen Presenting Cell*) dapat mengaktifasi G-protein yang kemudian memproduksi fosfolipase C. Interleukin-1 (IL-1) adalah peptida imunoregulator yang dihasilkan oleh monosit dan makrofag. Fosfolipase C kemudian menghidrolisis *fosfatidil inositol bifosfat* (PIP₂) menjadi produk reaktif *diasil gliserol* (DAG) dan *inositol trifosfat* (IP₃). Reaksi tersebut berlangsung dalam membran plasma. IP₃ kemudian menstimulasi pelepasan Ca²⁺ kedalam sitoplasma sehingga konsentrasi Ca²⁺ meningkat. Peningkatan Ca²⁺ ini berperan penting dalam menstimulasi kerja enzim protein kinase C dan 5-

lipoksigenase. Protein kinase C menstimulasi produksi interleukin-2 (IL-2), IL-2 ini kemudian mengaktivasi sel B maupun sel T untuk berproliferasi (Pangkalan Ide, 2008).

2.3. Imunologi Tumor

2.3.1. Peran Sistem Imun

Sistem imun adalah semua mekanisme yang digunakan untuk mempertahankan keutuhan tubuh sebagai perlindungan terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan oleh berbagai bahan dalam lingkungan hidup. Pertahanan tersebut terdiri atas sistem imun spesifik (*adaptive/acquired*) dan non spesifik (*natural/innate*). Respon imun spesifik bergantung pada adanya pemaparan benda asing, pengenalan, kemudian reaksi terhadapnya. Sebaliknya respon nonspesifik terjadi sesudah pemaparan inisial dan pemaparan lanjutan terhadap benda asing. Kemudian terjadi diferensiasi selektif *self* dan *nonself* dimana respons nonspesifik ini tidak bergantung pada pengenalan spesifik. Respons imunologik menjalankan 3 fungsi yaitu pertahanan, homeostasis, dan pengawasan diri (*surveillance*) (Suwiyoga, 2004).

Penyimpangan atau ketidakseimbangan mekanisme pengawasan sistem imun hospes (*surveillance*) diduga sebagai penyebab dalam pertumbuhan neoplasma. Hal-hal yang menunjukkan adanya peranan

sistem imun pada kanker ditunjang oleh beberapa pengamatan sebagai berikut:

- Beberapa tumor tertentu dapat sembuh secara spontan
- Dari pemeriksaan *autopsy* ditemukan insiden keganasan tertentu 40 kali lebih tinggi jika dibandingkan dengan kejadian secara klinik.
- Pada penderita dengan defisiensi imun atau yang mendapatkan pengobatan immunosupresi, ditemukan keganasan 200 kali dari yang diperkirakan. Seperti tingginya insiden sarkoma kaposi pada penderita *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS) (Suwiyoga, 2004).

2.3.2. Konsep *Immunosurveillance*

Immunosurveillance adalah suatu mekanisme yang digunakan oleh tubuh untuk bereaksi melawan setiap antigen yang diekspresikan oleh neoplasma. Fungsi primer dari sistem imun adalah untuk mengenal dan mendegradasi antigen asing (*nonsel*) yang timbul dalam tubuh. Dalam *immunosurveillance*, sel mutan dianggap akan mengekspresikan satu atau lebih antigen yang dapat dikenal sebagai *nonsel*. Sel mutan dianggap sering timbul dalam tubuh manusia, tetapi secara cepat dihancurkan oleh mekanisme imunologis. Pada tikus yang kehilangan imunitas seluler dan terpapar agen onkogenik akan lebih cepat timbul tumor. Ini dianggap merupakan bukti mekanisme *immunosurveillance*. Sel NK ternyata

paling berperan dalam *immunosurveillance* tumor, ia dapat membunuh sel tumor langsung tanpa perlu disensitisasi terlebih dahulu. Dalam *immunosurveillance* dianggap ada keadaan immunosupresi yang menyertai keadaan tumbuhnya tumor, terutama depresi sel NK. Salah satu syarat induksi tumor dengan bahan karsinogenik pada hewan percobaan adalah adanya gangguan pada sistem imun terutama sel NK (Halim dan Sahil, 2001).

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 immunosupresi seringkali mendahului pertumbuhan tumor
4. Di lain pihak tumor seringkali menyebabkan immunosupresi 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

intercellular adhesion molecule (ICAM) yang mengindikasikan sistem imun yang aktif (Kresno, 2003).

2.3.3. Respon Imun terhadap Tumor

Sel kanker dikenal sebagai *nonself* yang bersifat antigenik pada sistem imunitas tubuh manusia sehingga ia akan menimbulkan respons imun secara seluler maupun humoral. Respons sistem imun terhadap sel kanker dapat dibagi dua yaitu humoral dan seluler (Halim dan Sahil, 2001).

1) Peranan sistem imun humoral terhadap sel kanker

Imunitas humoral lebih sedikit berperan daripada imunitas seluler dalam proses penghancuran sel kanker, tetapi tubuh tetap membentuk antibodi terhadap antigen tumor (Halim dan Sahil, 2001). Dalam mekanisme imun humoral, imunoglobulin M (IgM) dan immunoglobulin G (IgG) bersama dengan komplemen memiliki kemampuan melisisikan sel tumor. Namun kemampuan ini tidak efektif terhadap tumor yang solid. Hal tersebut mungkin disebabkan karena antibodi membentuk kompleks imun yang mencegah sitotoksitas sel T (Baratawidjaja, 2004). Dua mekanisme antibodi diketahui dapat menghancurkan target kanker yaitu:

a) *Antibodi dependent cell mediated cytotoxicity* (ADCC)

Pada ADCC antibodi IgG spesifik berikatan terhadap *Tumor Associated Antigen* (TAA) dan sel efektor yang membawa

reseptor untuk bagian Fc dari molekul Ig. Antibodi bertindak sebagai jembatan antara efektor dan target. Antibodi yang terikat dapat merangsang pelepasan superoksida atau peroksida dari sel efektor. Sel yang dapat bertindak sebagai efektor di sini adalah limfosit null (sel K), monosit, makrofag, leukosit PMN (polimorfonuklear) dan fragmen trombosit. Ini akan mengalami lisis optimal dalam 4 sampai 6 jam (Halim dan Sahil, 2001).

b) Complement Dependent Cytotoxicity

Di sini pengikatan antibodi ke permukaan sel tumor menyebabkan rangkaian peristiwa komplemen klasik dari C'1, 4, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9. Komponen C' akhir menciptakan saluran atau kebocoran pada permukaan sel tumor. IgG lebih efisien dibanding IgM dalam merangsang proses *complement dependent cytotoxicity* (Halim dan Sahil, 2001).

2) Peranan sistem imun seluler terhadap sel kanker

Pada pemeriksaan patologi-anatomik tumor, sering ditemukan infiltrat sel-sel yang terdiri atas sel fagosit mononuklear, limfosit, sedikit sel plasma dan sel mastosit. Sistem imun yang nonspesifik dapat langsung menghancurkan sel tumor tanpa sensitisasi sebelumnya. Efektor sistem imun tersebut adalah sel Tc, fagosit mononuklear, polinuklear, sel NK. Aktivasi sel T melibatkan sel Th dan sel Tc. Sel Th penting pada

pengerahan dan aktivasi makrofag dan sel NK (Halim dan Sahil, 2001).

a) Sitotoksitas melalui sel T

Kontak langsung antara sel target dan limfosit T menyebabkan interaksi antara reseptor spesifik pada permukaan sel T dengan antigen membran sel target yang mencetuskan induksi kerusakan membran yang bersifat lethal. Mekanisme penghancuran sel tumor yang pasti masih belum diketahui walaupun pengrusakan membran sel target dengan hilangnya integritas osmotik merupakan peristiwa akhir. Pelepasan limfotoksin (LT), interaksi membran-membran langsung dan aktifitas *T cell associated enzyme* seperti phospholipase diperkirakan merupakan penyebab rusaknya membran. Interleukin (IL), interferon (IFN) dan sel T mengaktifkan pula sel *Natural Killer* (NK). Sel ini berbentuk *large granulocytic lymphocyte* (LGL). Kebanyakan sel ini mengandung reseptor Fc dan banyak yang mengekspresikan antigen sel T. Lisis sel target dapat terjadi tanpa paparan pendahuluan dan target dapat dibunuh langsung (Halim dan Sahil, 2001).

Secara singkat, pola pembunuhan sel sasaran oleh sel T-sitotoksik berlangsung dalam 3 fase: 1) sel T terikat pada sel sasaran; 2) Isi vesikel berupa berbagai substansi (perforin,

TNF, limfotoksin, dan NK *cytotoxic factor*) dilepaskan sehingga dengan demikian sel sasaran mengalami kerusakan.

3) fase akhir, setelah sel sasaran mati (Kresno, 2003).

Sel NK menunjukkan beberapa spesifisitas yang lebih luas terhadap target tumor yang biasanya dibunuh lebih cepat dibanding sel normal. Kematian sel tumor dapat sebagai akibat paparan terhadap toxin yang terdapat dalam granula LGL, produksi superoksida atau aktivitas protease serine pada permukaan sel efektor. Sel NK diaktivasi IFN dan IL-2 *in vitro*. Aktivitas NK dapat dirangsang secara *in vitro* dengan pemberian IFN, inducer atau imunostimulan seperti *Bacille Calmette Guerin* (BCG) dan *Corynebacterium* (C) *parvum*. Penghambatan aktivasi sel NK terlihat pada beberapa PG (PGE1, PGE2, PGA1 dan PGA2), phorbol ester, glukokortikoid dan siklofosfamid. Pada banyak kasus, agen ini langsung mempengaruhi aktivitas NK, sel supresor juga dapat mempengaruhi sel NK. Sel NC (*Natural Cytotoxic*) juga teridentifikasi menghancurkan sel tumor. Berbeda dengan sel NK, sel NC kelihatannya distimulasi oleh IL-3 dan relatif tahan terhadap glukokortikoid dan siklofosfamid. Populasi LAK (*lymphocyte activated killer*) sel dapat tumbuh di bawah pengaruh IL-2 (Halim dan Sahil, 2001).

b) Sitotoksisitas melalui makrofag

Makrofag yang teraktivasi berikatan dengan sel neoplastik lebih cepat dibanding dengan sel normal. Pengikatan khusus makrofag yang teraktivasi ke membran sel tumor adalah melalui struktur yang sensitif terhadap tripsin. Pengikatan akan bertambah kuat dan erat dalam 1 sampai 3 jam dan ikatan ini akan mematikan sel. Sekali pengikatan terjadi, mekanisme sitotoksitas melalui makrofag berlanjut dengan transfer enzim lisosim, superoksida, protease, faktor sitotoksik yang resisten terhadap inhibitor protease dan yang menyerupai limfotoksin (LT). Sekali teraktivasi, makrofag dapat menghasilkan PG yang dapat membatasi aktivasinya sendiri (Halim dan Sahil, 2001).

Makrofag yang teraktivasi dapat menekan proliferasi limfosit, aktivitas NK dan produksi mediator. Aktivasi supresi dapat berhubungan dengan pelepasan PG atau produksi superoksida. Sebagai tambahan, makrofag dapat merangsang dan juga menghambat pertumbuhan sel tumor, yang bergantung dengan bagian yang rentan dari sel tumor, *ratio* makrofag dengan sel target dan status fungsional makrofag. Indometasin dapat menghambat efek perangsangan makrofag pada pertumbuhan tumor ovarium yang diperkirakan prostaglandin mungkin berperan sebagai mediatornya. *Macrophage derived factor* dapat merangsang

pertumbuhan tumor dan menekan imunitas sel T. Akumulasi makrofag dalam tumor mungkin menggambarkan interaksi makrofag kompleks dari beberapa faktor dan juga kinetik produksi monosit oleh sumsum tulang. Jadi status fungsional makrofag dalam tumor juga berperan selain jumlahnya (Halim dan Sahil, 2001).

Makrofag bila diaktifkan oleh limfokin, endotoksin, RNA dan IFN akan menunjukkan aktivasi berupa adanya perubahan morfologik, biokimiawi dan fungsi sel. Makrofag yang diaktifkan biasanya menjadi sitotoksik nonspesifik terhadap sel tumor *in vitro*. Makrofag dapat pula berfungsi sebagai efektor pada ADCC terhadap tumor. Di samping itu makrofag dapat menimbulkan efek negatif berupa supresi yang disebut makrofag supresor. Hal tersebut dapat disebabkan oleh tumor itu sendiri atau akibat pengobatan (Halim dan Sahil, 2001).

2.3.4. Immunological Escape

Walaupun ada sistim *immunosurveillance*, kanker dapat luput dari pengawasan sistem imun tubuh bila faktor-faktor yang menunjang pertumbuhan tumor lebih berpengaruh dibanding dengan faktor-faktor yang menekan tumor, sehingga terjadi apa yang dinamakan *immunological escape* kanker (Halim dan Sahil, 2001). Faktor-faktor yang mempengaruhi luputnya tumor dari pengawasan

sistem imun adalah sebagai berikut (Suwiyoga, 2004; Halim dan Sahil, 2001):

1. Kinetik tumor: pada binatang yang diimunisasi pemberian sel tumor dalam dosis kecil akan menimbulkan tumor, tetapi dosis besar akan ditolak. Sel tumor tersebut dapat menyelip tidak diketahui tubuh dan baru diketahui bila tumor sudah berkembang dan di luar kemampuan sistem imun untuk menghancurkannya.
2. Modulasi antigenik: antibodi dapat mengubah atau memodulasi permukaan sel tanpa menghilangkan determinan permukaan.
3. *Masking antigen*: molekul tertentu seperti sialomusin yang sering diikat permukaan sel tumor dapat menutupi antigen dan mencegah ikatan dengan limfosit. Sialomusin tersebut dapat dihancurkan oleh neuraminidase V. Cholerae.
4. *Shedding antigen/ pelepasan antigen*: antigen tumor yang dilepas dan larut dalam sirkulasi dapat mengganggu fungsi sel T dengan mengambil tempat pada reseptor antigen. Hal itu dapat pula terjadi dengan kompleks imun antigen antibodi.
5. Toleransi: virus kanker mamma pada tikus di sekresi dalam air susunya tetapi bayi tikus yang disusunya toleran terhadap tumor tersebut. Infeksi kongenital oleh virus yang terjadi pada tikus-tikus tersebut akan menimbulkan toleransi terhadap virus tersebut dan virus sejenis.

6. Limfosit yang terperangkap: limfosit spesifik terhadap tumor dapat terperangkap dalam kelenjar limfe. Antigen tumor yang terkumpul dalam kelenjar limfe yang letaknya berdekatan dengan lokasi tumor dapat menjadi toleran terhadap limfosit setempat, tetapi tidak terhadap limfosit kelenjar limfe yang letaknya jauh dari tumor.
7. Faktor genetik: kegagalan untuk mengaktifkan sel efektor T dapat disebabkan oleh karena faktor genetik.
8. Faktor penyekat: antigen tumor yang dilepas oleh sel dapat membentuk kompleks dengan antibodi spesifik yang dibentuk penjamu. Komplek tersebut dapat menghambat efek sitotoksisitas limfosit penjamu melalui 2 cara, yaitu dengan mengikat sel Th sehingga sel tersebut tidak dapat mengenal sel tumor dan memberikan pertolongan kepada sel Tc.
9. Produk tumor: prostaglandin yang dihasilkan tumor dapat mengganggu fungsi sel NK dan sel K. Faktor humoral lain dapat mengganggu respon inflamasi, kemotaksis, aktivasi komplemen secara nonspesifik dan menambah kebutuhan darah yang diperlukan tumor padat.
10. Faktor pertumbuhan: respons sel T bergantung pada interleukin. Gangguan pada makrofag untuk memproduksi interleukin-1, kurangnya kerja sama di antara subset-subset sel T dan produksi

interleukin-2 yang menurun akan mengurangi respons imun terhadap tumor.

11. Vaskularisasi: tumor mungkin mencapai diameter 1-2 mm sebelum terbentuk vaskularisasi. Pertumbuhan vaskuler merupakan pertumbuhan sel pejamu sendiri, sehingga endotel tumor dikenal sebagai self dan tidak ditolak, sehingga pada beberapa keganasan terus berproliferasi dengan antigen tersembunyi dibalik endotel vaskuler.

Sedangkan faktor *determinant* yang berpengaruh terhadap sistem imun adalah sebagai berikut (Baratawidjaja, 2004) :

- a. Keturunan

Peranan herediter yang menentukan resistensi terhadap infeksi atau penurunan imun adalah pada pasangan kembar.

- b. Usia

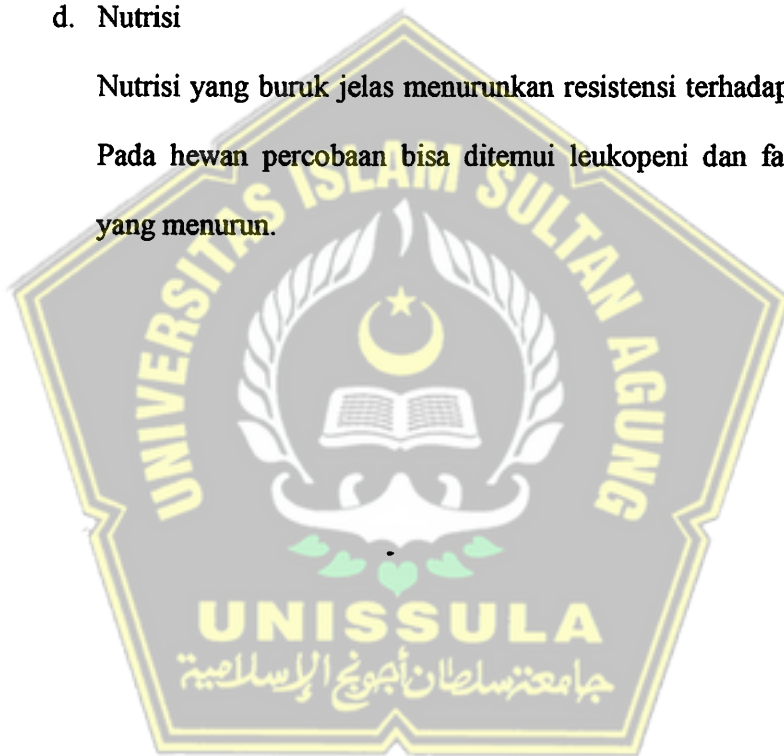
Penurunan imun lebih sering terjadi dan lebih berat pada anak usia balita, hewan usia muda dibanding dewasa. Hal tersebut disebabkan karena sistem imun yang belum matang pada usia muda. Usia lanjut disertai penurunan resistensi terhadap infeksi sering ditemukan karena kurangnya nutrisi. Akibatnya lebih menurunkan respons selular seperti proliferasi limfosit, sintesis sitokin dan juga respon antibodi.

- c. Hormon

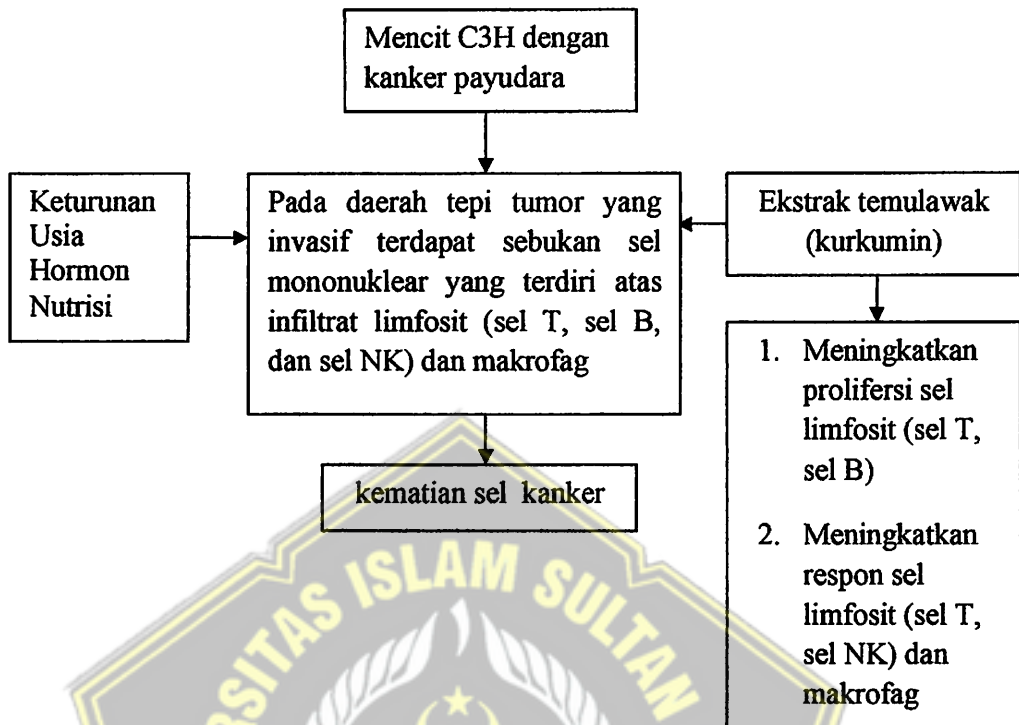
Sebelum pubertas, sistem imun pada pria dan wanita adalah sama. Sistem imun berkembang tanpa pengaruh hormon seks. Tapi setelah pubertas, hormon pada wanita (sistem endokrin) terintegrasi dengan respon imun yang tujuannya agar janin dalam kandungan tidak ditolak selama hamil. Sedangkan hormon androgen yang dilepas pria bersifat immunosupresi.

d. Nutrisi

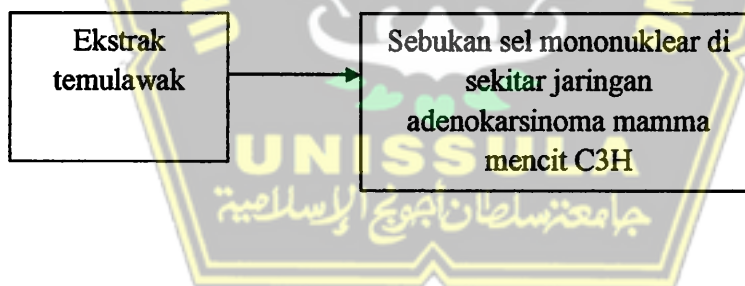
Nutrisi yang buruk jelas menurunkan resistensi terhadap infeksi. Pada hewan percobaan bisa ditemui leukopeni dan fagositosis yang menurun.



2.4. Kerangka Teori



2.5. Kerangka Konsep



2.6. Hipotesis

Ada pengaruh pemberian ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb*) terhadap peningkatan jumlah sebukan sel mononuklear di sekitar jaringan adenokarsinoma mamma pada mencit C3H yang telah diinokulasi jaringan tumor.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan metode penelitian *randomized post test only control group design*.

3.2. Variabel dan Definisi Operasional

3.2.1. Variabel

3.2.1.1. Variabel bebas

Ekstrak temulawak

3.2.1.2. Variabel tergantung

Jumlah sebukan sel mononuklear di sekitar jaringan adenokarsinoma mamma mencit C3H.

3.2.2. Definisi Operasional

3.2.2.1. Ekstrak temulawak

Ekstrak temulawak adalah ekstrak yang dibuat di Fakultas MIPA Universitas Diponegoro yang diekstraksi dengan pelarut etanol menggunakan metoda sokletasi, di dapatkan hasil 70,2 mg ekstrak temulawak pada setiap 1 kg rimpang temulawak. Dosis yang diberikan terdiri dari 3 dosis bertingkat yaitu 0,82 mg/hari, 1,64 mg/hari, dan 3,28

mg/hari diberikan dalam 0,2 ml secara per oral dengan spuit insulin selama 21 hari pada mencit C3H. Skala pengukurannya adalah skala rasio.

3.2.2.2. Jumlah sebukan sel mononuklear di sekitar jaringan adenokarsinoma mamma mencit C3H.

Sebukan sel mononuklear adalah infiltrat sel limfosit (sel T, sel B, dan sel NK) dan makrofag yang berada pada tepi jaringan tumor yang invasif. Pembacaan dan penilaian jumlah sebukan sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma mencit C3H, dinilai dengan membaca preparat yang telah jadi dengan mikroskop cahaya. Pembaca dan penilaian jumlah sebukan sel mononuklear dilakukan pada 5 lapangan pandang (4 disudut dan 1 ditengah) dengan pembesaran 400x untuk tiap preparat pada masing-masing kelompok. Adapun penilaian jumlah sebukan sel mononuklear di sekitar jaringan kanker menurut Sarjadi (1985) adalah sebagai berikut :

Sebukan sel mononuklear	Skor
a. Tidak ada (0-5)	0
b. Sedikit (sampai dengan $\frac{1}{4}$ lapangan pandang)	1
c. Sedang ($\frac{1}{4}$ sampai dengan $\frac{1}{2}$ lapangan pandang)	2
d. Banyak (lebih dari $\frac{1}{2}$ lapangan pandang)	3

Skala pengukurannya adalah skala rasio.

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi

3.3.1.1. Populasi target

Mencit C3H dengan klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Mammalia

Ordo : Rodentia

Famili : Muridae

Subfamili : Murinae

Genus : Mus

Spesies : *Mus musculus* galur C3H

3.3.1.2. Populasi terjangkau

Mencit C3H betina, umur 6 bulan, berat badan \pm 18-25

gram yang dikembangkan di Laboratorium Patologi

Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

3.3.2. Sampel

3.3.2.1. Cara pengambilan sampel

Metode pengambilan sampel dari penelitian ini adalah dengan cara *simple random sampling*.

3.3.2.2. Besar sampel

Besar sampel untuk penelitian eksperimental ini berdasarkan WHO yakni setiap kelompok minimal 5 ekor. Dengan jumlah kelompok 4, ditentukan jumlah hewan coba tiap kelompok sebesar 6 ekor, maka besar sampel secara keseluruhan adalah 24 ekor.

3.4. Kriteria Inklusi dan Kriteria Eksklusi

3.4.1. Kriteria inklusi

3.4.1.1. Mencit C3H, umur 6 bulan, sehat, berat \pm 18-25 gram, dan telah tumbuh tumor setelah dilakukan inokulasi.

3.4.2. Kriteria eksklusi

3.4.2.1. Tidak tumbuh tumor setelah dilakukan inokulasi

3.4.2.2. Mencit tampak sakit (gerakan tidak aktif) dan terdapat kelainan anatomis.

3.5. Instrumen dan Bahan Penelitian

3.5.1. Instrumen

3.5.1.1. Alat untuk pembuatan ekstrak temulawak

3.5.1.1.1. Soklet kapasitas 50 mg

3.5.1.1.2. Labu rotary evaporator

3.5.1.1.3. Oven

3.5.1.2. Kandang mencit

3.5.1.3. Alat untuk inokulasi jaringan tumor pada mencit.

3.5.1.3.1. Cawan petri ukuran 6 dan 15 cm

3.5.1.3.2. Cawan ukuran 10 cm

3.5.1.3.3. Spuit 1 cc

3.5.1.3.4. Jarum suntik *trocar*

3.5.1.3.5. Gunting lurus 10 cm

3.5.1.3.6. Gunting bengkok 10 cm

3.5.1.3.7. Pinset anatomi 10 cm

3.5.1.3.8. Alas fiksasi

3.5.1.4. Alat untuk pembuatan sediaan penelitian dengan pewarnaan hematoksilin-eosin

3.4.1.4.1. *Digital Tissue Processor Leica^R*

3.4.1.4.2. *Tissue Blocking Leica^R EG-1160*

3.4.1.4.3. Inkubator suhu 56⁰ C *Memmert^R*

3.4.1.4.4. Mikrotom *Leica^R RM-2135*

3.4.1.4.5. *Auto Stainer Leica-XL^R*

3.4.1.4.6. Kaca objek dan kaca penutup

3.5.1.5. Alat pengamatan sediaan *Multi Head Microscope Olympus^R*

3.5.2. Bahan Penelitian

3.5.2.1. Bahan untuk pembuatan Ekstrak temulawak

3.5.2.1.1. Satu kilogram rimpang temulawak

3.5.2.1.2. Etanol

3.5.2.1.3. *Aquadest*

3.5.2.2. Bahan untuk inokulasi tumor pada mencit

3.5.2.2.1. Alkohol 70%

3.5.2.2.2. Larutan garam fisiologik

3.5.2.2.3. Es batu

3.5.2.2.4. Mencit donor bertumor

3.5.2.2.5. Mencit resipien

3.5.2.3. Bahan untuk pemeriksaan histopatologi rutin

3.5.2.3.1. Formalin buffer 10%

3.5.2.3.2. Alkohol 50%, 70%, 80%, 96%, absolute, xylol

3.5.2.3.3. Parafin cair (Histoplast)

3.5.2.3.4. Albumin dan Poly-L-Lysine

3.5.2.3.5. Bahan pengecatan hematoksilin-eosin (HE)

3.5.2.3.6. Canada balsam dan Entelan

3.6. Cara Penelitian

3.6.1. Cara Perlakuan

Lebih dari dua puluh empat ekor mencit C3H yang dipilih secara acak ditempatkan pada kandang secara individual dan diberi ransum pakan standard dan minum secara ad libitum. Sebelum perlakuan, mencit menjalani masa adaptasi selama 1 minggu. Jaringan tumor diperoleh dari mencit donor. Jaringan tumor dari mencit donor ditransplantasikan ke mencit resipien. Sebelum diinokulasi, tumor dari mencit donor diinsisi biopsi dan dilakukan pemeriksaan histologi untuk konfirmasi jenis tumornya.

Mencit C3H tersebut lalu diinokulasi jaringan tumor dan diamati selama 4 hari. Mencit yang berhasil timbul benjolan tumor dipilih secara acak sebanyak 24 ekor, kemudian dibagi menjadi 4 kelompok secara acak masing-masing terdiri atas 6 ekor mencit. Masing-masing kelompok perlakuan dan kontrol dikandangkan secara individual serta mendapatkan ransum pakan standard dan minum secara ad libitum. Pemberian ekstrak temulawak secara per oral pada kelompok perlakuan dengan spuit insulin sekali sehari selama 21 hari.

Pembagian kelompok perlakuan:

- Kelompok I (K) : mencit bertumor diberi pakan standar dan tidak diberi ekstrak temulawak
- Kelompok II (PI) : mencit bertumor diberi pakan standar dan diberi ekstrak temulawak dengan dosis 0,82 mg/hari dalam 0,2 ml, diberikan selama 21 hari.
- Kelompok III (PII) : mencit bertumor diberi pakan standar dan diberi ekstrak temulawak dengan dosis 1,64 mg/hari dalam 0,2 ml, diberikan selama 21 hari.
- Kelompok IV (PIII) : mencit bertumor diberi pakan standar dan diberi ekstrak temulawak dengan dosis 3,28

mg/hari dalam 0,2 ml, diberikan selama 21 hari.

Pembedahan mencit dilakukan setelah perlakuan selesai. Pengambilan jaringan kanker payudara dilakukan setelah mencit dibedah. Mencit dianestesi dengan eter, lalu dibunuh dengan dengan cara dislokasi tulang leher. Kemudian jaringan kanker tersebut dimasukkan dalam botol berisi buffer formalin 10%. Setelah itu, didehidrasi dengan alkohol konsentrasi bertingkat, lalu dibuat blok parafin sesuai standar baku Histologi. Blok parafin ini kemudian dipotong dengan mikrotom dan dibuat preparat pada *objek glass* selanjutnya diwarnai dengan Hematoksin Eosin. Masing-masing dibuat 2 preparat untuk setiap mencit pada setiap kelompok.

Preparat yang sudah jadi dibaca hasilnya dengan mikroskop cahaya. Pembaca dan penilaian jumlah sebukan sel mononuklear dilakukan pada 5 lapangan pandang (4 disudut dan 1 ditengah) dengan pembesaran 400x untuk tiap preparat pada masing-masing kelompok.

3.6.2. Pembuatan Ekstrak Temulawak

3.6.2.1. Satu kilogram rimpang temulawak yang telah dikeringkan ditumbuk halus, kemudian serbuk dimasukkan ke dalam alat soklet (kapasitas 50 mg) dan dilakukan ekstraksi dengan cara sokletasi menggunakan pelarut etanol dengan siklus 8-10 kali.

3.6.2.2. Hasil ekstrak dimasukkan dalam labu *rotary evaporator* dan dilakukan destilasi vakum hingga menjadi pekat (suhu 40°C).

3.6.2.3. Ekstrak dikeringkan dalam oven dengan suhu 40°C selama 1 jam untuk menguapkan etanol.

3.6.2.4. Didapatkan hasil 0,0702 g ekstrak pada setiap 1 kg bahan maka persentasenya 7,02%, dan hasil ekstrak diencerkan dengan *aquadesi* sampai tercapai konsentrasi 70,2 mg/ml.

3.6.3. Perhitungan Dosis Ekstrak Temulawak

Faktor konversi dosis pada manusia yang beratnya 70 kg ke mencit yang berat badannya 20 gram adalah : 0,0026 (Laurence & Bacharach, 1964). Dosis temulawak didasarkan pada dosis pemberian pada manusia berkisar antara 8.000-10.000 mg (Aggarwal dkk, 2003, Sharma dkk, 2005), diambil dosis rata-ratanya 9.000 mg kemudian dikalikan konstanta uji terapi pada hewan coba (mencit) yaitu 0,0026 maka diperoleh dosis untuk mencit adalah 23,4 mg. Dengan mempertimbangkan perolehan ekstrak temulawak terhadap 1 kg rimpang temulawak adalah 0,0702 g = 70,2 mg, sehingga persentase hasil ekstrak temulawak sebesar 7,02%. Dosis ekstrak temulawak untuk mencit adalah $23,4\text{ mg} \times 7,02\% = 1,64\text{ mg/hari}$. Untuk penetapan dosis selanjutnya menggunakan kelipatan dua, maka di dapatkan dosis berturut-turut ialah 0,84 mg/hari, 1,64 mg/hari, 3,28 mg/hari.

Tiap dosis kemudian di larutkan dalam *aquadest* sampai di dapatkan konsentrasi hasil ekstrak 0,84 mg/ml, 1,64 mg/ml, 3,28 mg/ml. Masing-masing dosis ekstrak temulawak diberikan dalam 0,2 ml pada mencit C3H secara per oral dengan menggunakan spuit insulin tiap harinya.

3.6.4. Cara Inokulasi Jaringan Tumor pada Mencit

3.6.4.1. Mencit donor dimatikan dengan eter, kemudian diletakkan terlentang pada tatakan/alas fiksasi dan keempat kakinya difiksasi dengan jarum.

3.5.4.2. Kulit di bagian yang bertumor diusap dengan alkohol 70%, kemudian dibuat sayatan dengan gunting lurus, untuk mengeluarkan tumor.

3.5.4.3. Tumor diletakkan di cawan petri kecil yang telah terlebih dahulu dicuci dengan garam fisiologis dan diletakkan di atas es.

3.5.4.4. Amati bentuk dan keadaan tumor, kemudian ambil/potong jaringan tumor yang masih baik yaitu bagian yang tanpa nekrosis (biasanya di daerah tepi jika tumor besar) sebanyak kira-kira yang dapat menghasikan bubur tumor paling sedikit 1 ml dan taruh di cawan 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

pertikelnya dapat melewati jarum trokar. Tambahkan garam fisiologis lebih kurang sama banyak dengan volume tumor.

3.5.4.5. Bubur tumor disuntikkan subkutan di aksila kanan mencit dengan dosis 0,2 ml menggunakan spuit insulin dengan ketepatan 10^{-1} ml.

3.5.4.6. Sisa tumor yang padat dimasukkan ke dalam botol formalin untuk dibuat sediaan mikroskopik.

3.5.4.7. Masing-masing mencit diberi nomor pada telinganya dan dimasukkan ke dalam kandang berbeda yang diberi label berisi: jenis kelompok perlakuan dan tanggal inokulasi.

3.6.5. Prosedur Pembuatan Preparat Jaringan dengan Pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE)

Adapun cara pembuatan preparat jaringan dengan pewarnaan HE adalah sebagai berikut:

3.6.5.1. Sediaan jaringan yang didapat kemudian diukur secara makroskopik lalu dipotong basah yakni pemotongan jaringan tersebut dengan pemotongan langsung.

3.6.5.2. Setelah pemotongan basah dari jaringan tersebut, jaringan difiksasi dengan larutan formalin 10% dengan waktu kira-kira 24 jam.

3.6.5.3. Cetakan dikeluarkan dari larutan formalin 10% dikeringkan lalu direndam air selama 15 sampai 30 menit, dengan tujuan menghilangkan formalin yang masih melekat.

- 3.6.5.4. Setelah 15 – 30 menit cetakan direndam di air kemudian diganti dengan larutan aceton I, II, dan III, dicelupkan selama kira – kira 1 jam dalam setiap larutan aceton.
- 3.6.5.5. Kemudian dimasukkan ke dalam oven yang telah diisi parafin cair I, II, III dengan pemanasan 60° Celcius selama 1 jam dalam setiap cairan parafinnya.
- 3.6.5.6. Sediaan dapat dibuat cupe dalam potongan parafin cair ditunggu hingga membeku.
- 3.6.5.7. Potongan tersebut dipotong dengan mikrotom dengan tebal irisan yang biasa dipergunakan adalah $4\ \mu\text{m}$.
- Cara kerja mikrotom:
- Preparat yang telah dimasukkan kedalam parafin (potongan jaringan) diletakkan pada alat pemegang atau perekat dengan metode pemanasan.
 - Alat mikrotom disiapkan untuk pemotongan jaringan (biasanya dipergunakan ketebalan $4\ \mu\text{m}$).
 - Kemudian alat penarik turun jaringan dijalankan sehingga potongan jaringan akan terpotong dan dapat diambil bagian jaringan yang terpisah dari blok parafin.
- 3.6.5.8. Potongan tadi dimasukkan ke dalam air hangat kuku agar tidak melipat dan mengembang sehingga mudah dibuat preparat.

- 3.6.5.9. Potongan jaringan yang sudah dimasukkan ke dalam air, diambil dengan menggunakan kaca obyek yang sebelumnya telah dilapisi putih telur sebagai perekat jaringan, agar jaringan dapat diambil/terekat pada kaca obyek.
- 3.6.5.10. Setelah jaringan merekat pada objek glass maka lapisan parafin yang masih melekat dihilangkan dengan dipanaskan di atas lampu spirtus kemudian didinginkan.
- 3.6.5.11. Setelah dingin, jaringan yang sudah melekat pada objek glass dimasukkan ke dalam xylol lilin I, II, dan III selama kurang lebih 30 menit lalu dikeringkan.
- 3.6.5.12. Kemudian dimasukkan ke dalam larutan alkohol 100% I, II, III, dengan menaik turunkan preparat namun tidak diperbolehkan preparat tersebut tergesek pada dinding gelas sekitarnya, agar preparat tidak rusak.
- 3.6.5.13. Kemudian preparat dimasukkan ke dalam air, lalu dimasukkan ke dalam larutan cat hematoksilin selama kira – kira 5 menit.
- 3.6.5.14. Dimasukkan ke dalam air kemudian dicelupkan ke dalam larutan zoutzure 70% (terdiri atas alkohol 100% sebanyak 76 cc ditambah aquadest sebanyak 24 cc dengan Hcl 1 cc) yang fungsinya adalah meratakan dari cairan tersebut.

3.6.5.15. Dimasukkan ke dalam air lagi lalu dikeringkan kemudian dimasukkan ke dalam alkohol 96% lalu dimasukkan ke dalam alkohol 70%.

3.6.5.16. Setelah itu dimasukkan ke dalam cairan eosin selama 1 menit.

3.6.5.17. Dimasukkan ke dalam alkohol 70% kemudian alkohol 85% kemudian dimasukkan ke dalam alkohol 96% dan dikeringkan.

3.6.5.18. Dimasukkan dalam xylol, kemudian xylol pembersih I, II, dan III kira – kira 1 jam untuk meratakan zat pewarna lalu dikeringkan.

3.6.5.19. Kemudian ditutup dengan cairan Kanada balsem, diberi minyak emersi dan ditutup dengan deck glass dan siap dilihat di bawah mikroskop.

3.7. Tempat dan Waktu Penelitian

3.7.1. Tempat

Tempat pembuatan ekstrak jahe di Fakultas MIPA Universitas Diponegoro. Tempat penelitian, perlakuan pada hewan coba, dan pembuatan preparat bertempat di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia selama 21 hari. Tempat analisa jumlah sebukan sel mononuklear pada jaringan kanker

payudara di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung.

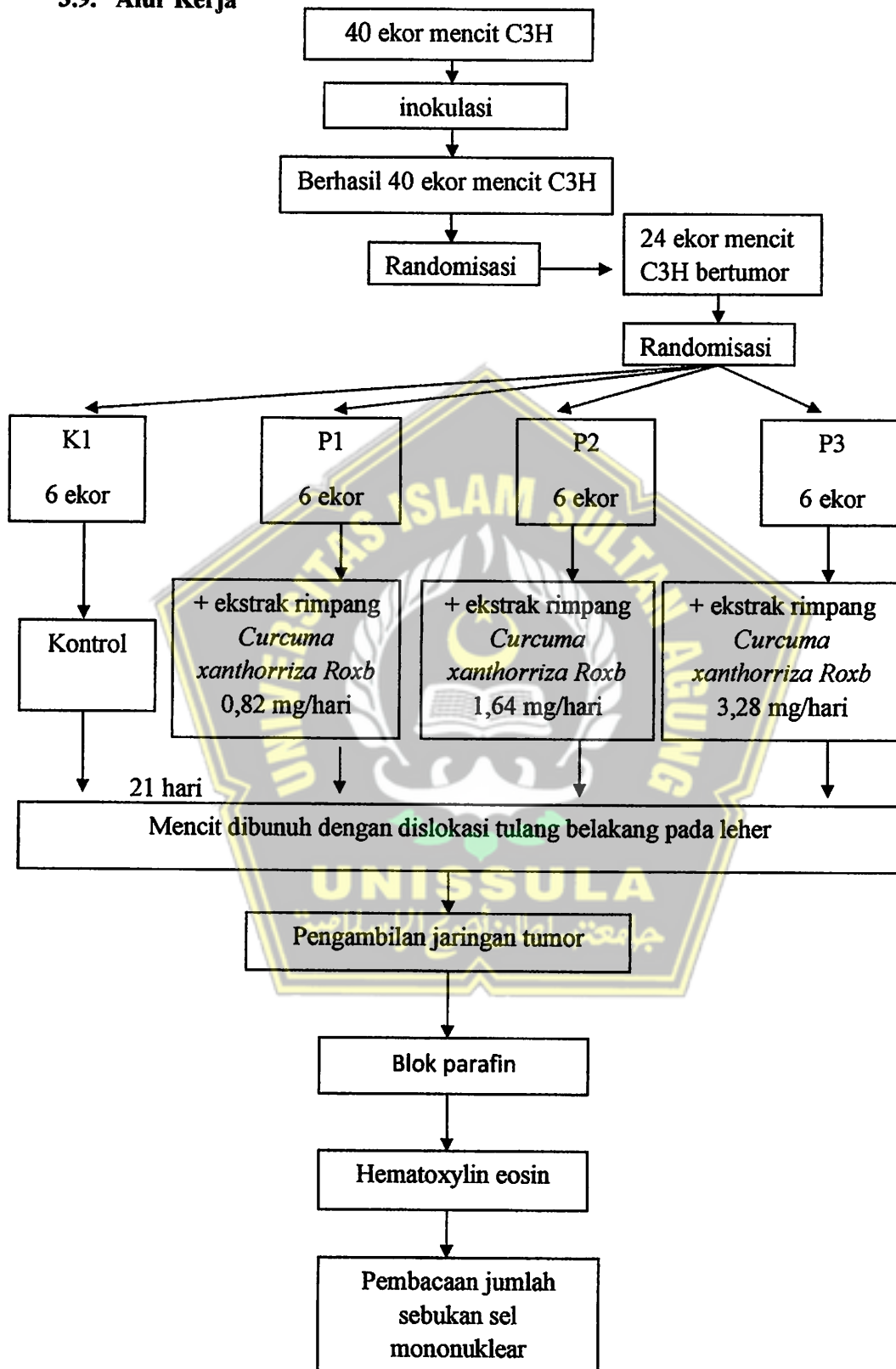
3.7.2. Waktu

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2010-Januari 2011.

3.8. Analisis Hasil

Pengumpulan data dilakukan dengan pemeriksaan histopatologi, untuk mengetahui gambaran histopatologi sebukan sel mononuklear dalam jaringan adenokarsinoma mamma mencit strain C3H. Data yang diperoleh digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak temulawak terhadap sebukan sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma mencit strain C3H, maka dilakukan uji statistik yang terlebih dahulu dilakukan uji normalitas data dengan *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas dengan *Levene Statistic* dimana didapatkan $p < 0,05$ sehingga data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen. Karena data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen maka syarat uji *Anova* tidak terpenuhi, maka dilakukan uji non parametrik yaitu uji *Kruskall-Wallis* yang didapatkan nilai $p < 0,05$, sehingga paling tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Kemudian dilanjutkan dengan menggunakan uji *Mann-Whitney*.

3.9. Alur Kerja



BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini sejumlah 24 ekor mencit C3H yang rata-rata berumur enam bulan, dan berat badan berkisar antara 18-25 gram. Sampel penelitian yang digunakan mencit C3H yang telah tumbuh tumor dimana sebelumnya keseluruhan sampel diinokulasi dengan jaringan tumor yang berasal dari mencit donor dan melewati masa laten selama empat hari. Kemudian sampel yang telah bertumor tersebut dibagi menjadi empat kelompok secara acak, setiap kelompok terdiri dari enam ekor. Perlakuan mulai diberikan pada hari kelima selama 21 hari, dan selama perlakuan sampel yang digunakan tidak ada yang mati.

Setelah perlakuan selesai, semua sampel diterminasi dan jaringan tumornya diambil guna dibuat preparat histopatologi. Penentuan jumlah sebukan sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma berdasarkan kriteria menurut Sarjadi (1985). Pembacaan preparat menggunakan mikroskop cahaya pada 5 lapangan pandang dengan perbesaran 400 kali, dilakukan oleh ahli patologi anatomi. Hasil pembacaan histopatologi sebukan sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma pada setiap kelompok uji disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pembacaan Histopatologi Sebukan Sel Mononuklear Disekitar Jaringan Adenokarsinoma Mamma pada Masing-Masing Kelompok

Kelompok	Nomor Sampel	Lapang Pandang				
		1	2	3	4	5
Kontrol	1	0	0	0	0	0
	2	1	0	1	2	2
	3	0	0	0	0	0
	4	0	1	1	1	0
	5	1	1	1	2	1
	6	0	0	1	0	1
Perlakuan 1	1	1	1	2	1	2
	2	2	1	1	1	1
	3	1	1	1	1	2
	4	1	1	1	1	1
	5	1	1	1	1	1
	6	1	1	1	0	1
Perlakuan 2	1	2	2	2	2	2
	2	1	1	1	1	1
	3	1	1	2	1	2
	4	2	1	1	1	1
	5	2	2	2	2	2
	6	2	2	2	2	2
Perlakuan 3	1	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2
	3	1	1	1	0	0
	4	0	1	1	1	1
	5	0	1	1	1	1
	6	2	1	1	1	1

Keterangan:

Skor 0 tidak ada (0-5)

Skor 1 sedikit (sampai dengan $\frac{1}{4}$ lapangan pandang)

Skor 2 sedang ($\frac{1}{4}$ sampai dengan $\frac{1}{2}$ lapangan pandang)

Skor 3 banyak (lebih dari $\frac{1}{2}$ lapangan pandang)

(Sarjadi, 1985)

Penyajian data sebukan sel mononuklear pada setiap kelompok uji disajikan dalam tabel 2 sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran.

Tabel 2. Data Sebukan Sel Mononuklear pada Tiap Kelompok Uji

Kelompok	Median	Maksimum	Minimum
Kontrol	0	2	0
Perlakuan I	1	2	0
Perlakuan II	2	2	1
Perlakuan III	1	2	0

Untuk membuktikan bahwa pemberian ekstrak temulawak dapat secara signifikan meningkatkan jumlah sebukan sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma, dilakukan pengujian statistik. Pengujian normalitas data diperlukan untuk menentukan metode analisis yang sesuai.

Uji normalitas dilakukan dengan metode *Shapiro-Wilk*. Hasil pengujian data pada keempat kelompok diperoleh nilai $p < 0,05$ sehingga sebaran data tidak normal (lampiran 2). Uji *Anova* satu arah memiliki syarat mutlak data berdistribusi normal, sehingga dalam uji hipotesis tidak dapat dilakukan uji *Anova* satu arah. Oleh karena itu digunakan uji alternatif berupa uji *Kruskall-Wallis*.

Dari hasil uji *Kruskall-Wallis* didapatkan hasil nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$), sehingga paling tidak terdapat perbedaan yang bermakna (lampiran 3).

Kemudian untuk melihat kelompok mana yang berbeda bermakna dilanjutkan uji *Mann-Whitney* (lampiran 4).

Tabel 3. Hasil Uji Mann-Whitney

Pasangan Kelompok	Nilai p	Keterangan
Kontrol dan Perlakuan I	0,000	Bermakna
Kontrol dan Perlakuan II	0,000	Bermakna
Kontrol dan Perlakuan III	0,000	Bermakna
Perlakuan I dan Perlakuan II	0,000	Bermakna
Perlakuan I dan Perlakuan III	0,384	Tidak Bermakna
Perlakuan II dan Perlakuan III	0,033	Bermakna

Berdasarkan tabel uji *Mann-Whitney* menunjukkan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan I, II dan III, kelompok perlakuan I dengan kelompok perlakuan II, dan antara kelompok perlakuan II dan III ada perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$). Sedangkan antara kelompok perlakuan I dengan kelompok perlakuan III menunjukkan tidak adanya perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$).

4.2. Pembahasan

Dari hasil uji statistik menunjukkan bahwa sebulan sel mononuklear pada kelompok yang diberi perlakuan ekstrak temulawak dibanding dengan kelompok kontrol yang tidak diberi ekstrak temulawak terdapat perbedaan yang bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak temulawak secara *in vivo* dapat meningkatkan sebulan sel mononuklear. Sebulan sel mononuklear ialah infiltrat sel limfosit yang terdiri atas sel T, sel B, sel NK, dan makrofag yang terdapat pada tepi tumor yang invasif (Underwood, 2000). Peningkatan sel limfosit ini diduga karena terikatnya senyawa kurkumin yang terdapat pada ekstrak temulawak pada reseptor permukaan sel T dan sel B. Pengikatan antigen pada reseptor permukaan

sel T bersama interleukin 1 (IL-1) dari APC (*Antigen Presenting Cell*) dapat mengaktivasi G-protein yang kemudian memproduksi fosfolipase C. Interleukin-1 (IL-1) adalah peptida imunoregulator yang dihasilkan oleh monosit dan makrofag. Fosfolipase C kemudian menghidrolisis *fosfatidil inositol bifosfat* (PIP₂) menjadi produk reaktif *diasil gliserol* (DAG) dan *inositol trifosfat* (IP₃). Reaksi tersebut berlangsung dalam membran plasma. IP₃ kemudian menstimulasi pelepasan Ca²⁺ kedalam sitoplasma sehingga konsentrasi Ca²⁺ meningkat. Peningkatan Ca²⁺ ini berperan penting dalam menstimulasi kerja enzim protein kinase C dan 5-lipoksigenase. Protein kinase C menstimulasi produksi interleukin-2 (IL-2), IL-2 ini kemudian mengaktivasi sel B maupun sel T untuk berproliferasi (Pangkalan Ide, 2008).

Peningkatan sekuman sel mononuklear menunjukkan terstimulasinya sistem imun oleh sel kanker yang dikenal sebagai benda asing oleh tubuh (Abbas dan Lichtman, 2005). Fungsi sistem imun dalam hal ini berperan sebagai *immunosurveillance* yaitu sebagai protektif dengan cara mengenal dan menghancurkan sel-sel abnormal sebelum berkembang menjadi tumor atau membunuhnya kalau tumor itu sudah tumbuh (Kresno, 2001). Sistem imunitas seluler lebih banyak berperan daripada imunitas humoral pada proses penghancuran sel kanker. Sel kanker dapat menstimulasi respon imun dengan membentuk infiltrat sel mononuklear disekitar jaringan kanker (Kresno, 2001). Infiltrat sel mononuklear yang berperan dalam

melawan sel kanker antara lain sel limfosit (terutama sel T sitotoksik), sel NK, dan makrofag (Kresno, 2001).

Penelitian yang dilakukan Shao dkk (2002) menunjukkan bahwa kurkumin dapat meningkatkan efek terhadap fungsi utama dari sel T, sel *natural killer* (NK), makrofag, dan *splenocytes* total *in vivo*. Peningkatan respon limfosit tersebut juga terbukti pada penelitian yang dilakukan oleh Varalakshmi dkk (2008) dimana pemberian kurkumin yang dilakukan dengan injeksi (40 mg/kg BB/hari, i.p) selama 30 hari setiap interval 24 jam pada hewan coba tikus betina menunjukkan adanya peningkatan kemampuan proliferasi sel T yang diamati pada hewan perlakuan yang diinjeksi kurkumin. Hal ini diperkuat oleh penelitian yang dilakukan oleh Mardiwan (2006) dimana pemberian ekstrak tapak dara 19,6 mg/hari dan temulawak 10,4 mg/hari yang diberikan secara bersamaan menunjukkan perubahan ukuran tumor secara bermakna antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol. Akan tetapi pada penelitian yang lain dengan perlakuan yang sama yaitu ekstrak tapak dara 19,6 mg/hari dan temulawak 10,4 mg/hari yang diberikan secara bersamaan, tidak menunjukkan adanya perbedaan secara bermakna terhadap gambaran histopatologi kelenjar payudara (Naziya, 2006). Kelemahan pada penelitian ini adalah sampel yang digunakan lebih sedikit yaitu hanya enam ekor dan tidak ada variasi dosis.

Berdasarkan penelitian sebelumnya tersebut, pada penelitian ini sampel yang digunakan lebih banyak yaitu 24 ekor mencit C3H dan hanya

menggunakan satu variabel bebas yaitu ekstrak temulawak dengan berbagai dosis yaitu 0,82 mg/hari, 1,64 mg/hari, dan 3,28 mg/hari. Dari hasil uji statistik didapatkan perbedaan yang bermakna pada masing-masing dosis yang diberikan untuk tiap kelompok perlakuan, kecuali pada kelompok perlakuan I dengan kelompok perlakuan III. Dari hasil uji statistik juga didapatkan rerata sebulan sel mononuklear pada kelompok perlakuan II lebih tinggi dibanding kelompok perlakuan III. Hal ini berkaitan dengan mekanisme kerja obat (ekstrak temulawak), dimana efek obat umumnya timbul karena interaksi obat dengan reseptor pada sel suatu organisme. Intensitas efek obat berbanding lurus dengan fraksi reseptor yang diikatnya, dan intensitas efek mencapai maksimal bila seluruh reseptor diduduki oleh obat. Hubungan dosis dengan intensitas efek obat berkaitan dengan potensi obat yang menunjukkan rentang dosis obat yang menimbulkan efek. Besarnya potensi ini ditentukan oleh kadar obat yang mencapai reseptor dan afinitas obat terhadap reseptornya. Tetapi efek maksimal obat tidak selalu berhubungan dengan potensinya. Besarnya respon terhadap dosis juga sangat tergantung dari variasi biologi tiap individunya (Ganiswara, 2003). Selain itu juga sebulan sel mononuklear itu sendiri dipengaruhi oleh adanya faktor *determinant* seperti keturunan, usia, hormon, dan nutrisi (Baratawidjaja, 2004). Sehingga pada penelitian ini didapatkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak temulawak yang digunakan, sebulan sel mononuklear yang ditemukan tidak semakin meningkat.

Keterbatasan pada penelitian ialah hanya meneliti sebukan sel mononuklear secara menyeluruh karena pada penelitian ini peneliti hanya ingin mengetahui pengaruh yang ditimbulkan oleh pemberian ekstrak temulawak terhadap jumlah sebukan sel mononuklear. Tidak dibedakan jumlah tiap sebukan sel mononuklear itu sendiri seperti jumlah sel T, sel B, sel NK dan makrofag pada tiap lapang pandangnya karena harus melakukan pemeriksaan histopatologi dengan pengecatan yang berbeda-beda sehingga biaya yang digunakan lebih mahal dan waktu penelitian yang lebih lama. Disamping itu pada penelitian ini ekstrak temulawak yang digunakan adalah ekstrak kasar sehingga banyak senyawa aktif yang terkandung didalamnya seperti minyak atsiri (zingiberin, xanthorrhizol, turmeron, germakron, monoterpen, dll) dan kurkuminoid (kurkumin, bisdemetoksikurkumin, dan demetoksikurkumin). Berdasarkan teori, senyawa aktif yang mempunyai efektivitas sebagai anti tumor adalah kurkumin sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan melakukan penarikan satu senyawa aktif spesifik pada ekstrak temulawak seperti kurkumin terhadap sebukan sel mononuklear.

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

- 5.1.1. Pemberian ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb*) dapat meningkatkan jumlah sebukan sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma yang diamati pada mencit C3H yang telah diinokulasi jaringan tumor dibandingkan dengan kelompok kontrol yang tidak diberi ekstrak temulawak.
- 5.1.2. Semakin tinggi dosis ekstrak temulawak yang digunakan, sebukan sel mononuklear yang didapatkan tidak semakin meningkat.

5.2. Saran

- 5.2.1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan mengamati salah satu sebukan sel mononuklear yang lebih spesifik seperti sel T, sel B, sel NK dan makrofag.
- 5.2.2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menarik salah satu senyawa aktif seperti kurkumin pada ekstrak temulawak terhadap sebukan sel mononuklear.

Daftar Pustaka

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., 2005, Cellular and molecular immunology, Philadelphia, 16: 391-340
- Adi, L.T., 2007, Sehat Berdasarkan Golongan Darah, AgroMedia Pustaka, Jakarta, 100
- Afifah, E., Tim Lentera, 2004, Khasiat dan Manfaat Temulawak Rimpang Penyembuh Aneka Penyakit, Agro Media Pustaka, Jakarta, 4-9, 12, 16
- Aggarwal, B.B., Kumar, A., Bharti, A.C., 2003, Anticancer Potential of Curcumin: Preclinical and Clinical Studies, *Anticancer Research*, 23, 362-398
- Baratawidjaja, K., 2004, Imunologi Dasar, Ed 6, Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, 34-41, 363
- Breast Cancer Facts and Figures, 2009, American Cancer Society, Inc., Atlanta, 1-2
- Dahlan, M.S., 2008, Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan: Deskriptif, Bivariat, dan Multivariat, Dilengkapi Aplikasi dengan Menggunakan SPSS, Edisi 3, Salemba Medika, 83-94
- Dalimarta, S., 2004, Atlas Tumbuhan Obat Indonesia, jil 3, Pustaka Bunda, Jakarta, 131
- Damjanov, I., 2000, Buku Teks & Atlas Berwarna Histopatologi, Widya Medika, Jakarta, 57, 353-354
- Faiz, M., Moffat, D., 2004, At a Glance Anatomi, Erlangga, Jakarta, 64-65
- Ganiswara, S.G., 2003, Farmakologi dan Terapi, Ed. 4, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, 10-16
- Halim, B., Sahil, M.F., 2001, Imunologi Tumor, Cermin Dunia Kedokteran, 132: 47-50
- Hassett, M.J., O'Malley, A.J., Pakes, J.R., Newhouse, J.P., Earle, C.C., 2006, Frequency and Cost of Chemotherapy-Related Serious Adverse Effects in a Population Sample of Women with Breast Cancer, *Journal of the National Cancer Institute*, 98, 1108-1117
- Hermanto, N., 2003, Menaklukkan Penyakit Bersama Mahkota Dewa, AgroMedia Pustaka, Jakarta, 23

- Ireson, C.R., Jones, D.J., Orr, S., Coughtrie, M.W., Boocock, D.J., Williams, M.L., Fanner, P.B., Steward, W.P., Gescher, A.J., 2002, Metabolism of The Cancer Chemopreventive Agent Curcumin in Human and Rat Intestine. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 11: 105-111
- Katzung, B.G., 2004, Farmakologi Dasar dan Klinik, Salemba Medika, Jakarta, 3 jil: 310-322
- Kintoko, 2006, Prospek Pengembangan Tanaman Obat, Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, 1
- Kresno, S.B., 2003, Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium, Balai Penerbit FKUI, Jakarta, 123-131, 209
- Laurance, D.R., Bacharach, A.L., 1964, Evaluation of Drug Activities Pharmacometrics, Vol 1 part 3 pp, Academic Press Inc, 315-456
- Lin, J., Lin-Shiau, S., 2001, Mechanisms of Cancer Chemoprevention by Curcumin, *National Science Council ROC*, 25, 59-66
- Mangan, Y., 2003, Cara Bijak Menaklukan Kanker, AgroMedia Pustaka, Jakarta, 56
- Mardiawan, D., 2006, Pengaruh Pemberian Ekstrak Tapak Dara (*Catharanthus roseus*) dan Temulawak (*Curcuma Xanthorrhiza*) Terhadap Ukuran Tumor dan Gambaran Histologi Paru dan Kelenjar Limfe Aksilla Mencit C3H yang telah diinokulasi Sel Adenokarsinoma Mammariae, Semarang, 1-9
- Naziya, 2006, Pengaruh Pemberian Ekstrak Tapak Dara (*Catharanthus roseus*) dan Temulawak (*Curcuma Xanthorrhiza*) Terhadap Gambaran Histologi Kelenjar Payudara Mencit C3H yang telah diinokulasi Sel Adenokarsinoma Mammariae, Semarang, 1
- Pangkalan Ide, 2008, Gaya Hidup Penghambat Al-Zheimer, PT Elex Media Komputindo, Jakarta, 144
- Pangkalan Ide, 2008, Dark Chocolate Healing, Mengungkap Khasiat Cokelat terhadap Sirkulasi Darah dan Imunitas Tubuh, PT Elex Media Komputindo, Jakarta, 192
- Profil Kesehatan Provinsi Jawa Tengah, 2008, Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Tengah, Semarang, 38-39.
- Riyasa, I.K.T., Notosiswoyo, R.M., 2004, Keterkaitan Antara Karakteristik Penderita Kanker Payudara dengan Upaya Pengobatan Tradisional, *Meditek*, Jakarta, 12: 1-9
- Rukmana, R., 2006, Temulawak Tanaman Rempah dan Obat, Kanisius, Yogyakarta, 14

- Robbins, Kumar, Cotran., 2007, Buku Ajar Patologi Robbins, Ed. 7, Vol. 1, EGC, Jakarta, 186
- Robbins, Kumar, Cotran., 2007, Buku Ajar Patologi Robbins, Ed. 7, Vol. 2, EGC, Jakarta, 795-800
- Robbins, Cotran., 2008, Buku Saku Dasar Patologi Penyakit, Ed. 7, EGC, Jakarta, 32
- Said, A., 2006, Khasiat dan Manfaat Temulawak, PT Sinar Wadya Lestari, Jakarta, 4-29
- Sarjadi., 1985, Karsinoma epidermoid serviks uterus (Beberapa aspek epidemiologi serta peran histopatologi dan pertanda tumor dalam penentuan prognosis), Universitas Diponegoro, Semarang, 30
- Shao, Z., Shen, Z., Liu, C., Sartippour, M.R., Go, V.L., Heber, D., and Nguyen, M., 2002, Curcumin Exerts Multiple Suppressive Effects on Human Breast Carcinoma Cells, *Int. J. Cancer*, 98, 234-240
- Sharma, R.A., Gescher, A.J., Steward, W.P., 2005, Curcumin: The story so far. *European Journal of Cancer*, 41, 1955-1968
- Sjamsuhidajat, R., de Jong, W., 2004, Buku Ajar Ilmu Bedah, Ed 2, EGC, Jakarta, 394
- Suwiyoga, K., 2006, Imunologi Tumor, dalam: Ginekologi, YBPSP, Jakarta, 81, 85
- Tjay, T.H., Rahardja, K., 2007, Obat-Obat Penting Khasiat, Penggunaan, dan Efek-efek Sampingnya, edisi 6, PT Elek Media Komputindo, Jakarta, 277
- Ubbricht, C., Seamon, E., 2006, Appendix Safety: Adverse Effects, Interactions, Pharmacokinetics. Dalam: *Natural Standard Herbal Pharmacotherapy An Evidence- Based Approach*, Mosby Elsevier, St. Louis, Missouri, 564
- Underwood, J,C,E., 2000, Patologi Umum dan Sistemik, Ed. 2, Vol. 1, Editor edisi bahasa Indonesia: Sarjadi, EGC, Jakarta, 189
- Varalakshmi Ch,et al., 2008, Immunomodulatory effects of curcumin: In-vivo, *International Immunopharmacology* (2008) , 8, 688-700