

# TESIS

## PENGARUH EKSTRAK TEH HITAM TERHADAP PENINGKATAN KETAHANAN IMUNOLOGIK SELULER SEBAGAI PENGHAMBAT PROGRESIVITAS TUMOR MUKOSA RONGGA MULUT MENCIT YANG TERPAPAR BENZOPIRENE

Penelitian eksperimental laboratorik



**THERESIA INDAH BUDHY S.**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2000**

**PENGARUH EKSTRAK TEH HITAM TERHADAP PENINGKATAN  
KETAHANAN IMUNOLOGIK SELULER SEBAGAI  
PENGHAMBAT PROGRESIVITAS TUMOR  
MUKOSA RONGGA MULUT MENCIT  
YANG TERPAPAR BENZOPIRENE**

**Penelitian eksperimental laboratorik**

**TESIS**

Untuk Memperoleh Gelar Magister  
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar  
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh :

**THERESIA INDAH BUDHY S.  
NIM. 099712500. M**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2000**

## UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur ke hadirat Allah Yang Maha Pengasih Lagi Maha Penyayang atas segala rahmat dan karunianya sehingga tesis ini dapat saya selesaikan.

Saya ucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan dan Kebudayaan yang telah memberikan bantuan finansial sehingga meringankan beban saya untuk menyelesaikan tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Prof.H.Sudarto,dr,DTM&H,Ph.D Rektor Universitas Airlangga yang memberikan kesempatan dan fasilitas kepada saya untuk mengikuti Program Pascasarjana di Universitas Airlangga.

Prof.Dr.H.Soedijono,dr Direktur Program Pascasarjana yang memberikan kesempatan dan fasilitas kepada saya untuk mengikuti Program Pascasarjana di Universitas Airlangga.

Dr.Boedihardjo, drg.,M.Sc.,Sp.Perio Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Program Magister.

Terima kasih saya ucapkan kepada Mahayatma Soendoro, drg Kepala Laboratorium Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang telah memberi kesempatan untuk mengikuti Program Magister.

Terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Prof.Dr.Roem Soedoko,dr,Sp.PA selaku Pembimbing Utama yang dengan penuh perhatian, kesabaran dan bimbingan, saran, masukan-masukan yang aspiratif dalam penelitian ini.

Terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Dr.Suhartono Taat Putra,dr,MS selaku Pembimbing yang dengan penuh perhatian dan tulus ikhlas memberikan bimbingan, saran serta penuh kesabaran dalam memeriksa tesis ini.

Terima kasih kepada Dr.Watadianto,dr,DSPA yang dengan tulus memberikan dorongan moril dan bimbingan sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini.

Terima kasih kepada Dr.Kuntoro,MPH selaku konsultan yang telah memberikan saran dan masukan mengenai analisa statistik.

Terima kasih kepada Soewarni, drg mantan Kepala Laboratorium Patologi Mulut FKG Unair yang banyak memberi dorongan kepada saya untuk menempuh tugas belajar.

Terima kasih kepada Dr.Mulja Hadi Santoso di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Farmasi dan Sdri Idha Kusumawati S.,Si, M.Si, Sdr Sudjarwo dari Lab.Fitokimia Fakultas Farmasi yang telah banyak membantu di bidang Farmasi sehingga penelitian ini dapat terselesaikan.

Terima kasih kepada para staf pengajar di Lab.Biologi Oral dan Lab.Patologi anatomi FK Unair, yang dengan tulus memberi bantuan saya selama tugas belajar.

Terima kasih kepada Bp. Supardi dari Lab. Kandang Fakultas Farmasi, Bp. Supeni, Bp. Eko, Bp. Budi dari Lab. Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran, Sdri. Leni, Sdri. Bayu dari Lab. Gramik, Sdr. Agus dari PAU Jogjakarta, Sdri. Anik Sunarti dari FKG Unair yang membantu sejak awal penelitian ini dilakukan sampai penyelesaian tesis.

Kepada Suami saya Hendro Rumpoko dan anak saya Lauren, Sisca, Andrew, Ayah kandung Bp. Budhyan dan Ibu Mertua Ny. Suharsono yang dengan setia, penuh kasih sayang dan pengorbanan membantu serta memberikan dorongan moril maupun doa restu sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan ini.

Saya ucapkan terima kasih kepada semua pihak yang tidak mungkin saya sebutkan satu persatu yang telah membantu terselesainya tesis ini.

## RINGKASAN

Khasiat teh hitam secara tradisional telah diyakini sebagai obat (Junzhi, 1991). Didalam teh hitam terkandung senyawa aktif yang bersifat antimutagenik (Chen, 1997). Hal serupa juga dilaporkan Yoshino (1994) bahwa teh hitam dapat meningkatkan aktivitas sel B. Pada penelitian ini diungkap pengaruh ekstrak teh hitam terhadap peningkatan ketahanan imunologik seluler sebagai penghambat progresivitas tumor mukosa rongga mulut mencit yang terpapar benzopirene.

Rancangan penelitian dengan metode *experiment post test control only group design*, dengan hewan coba mencit jantan, kondisi sehat, usia 1-2 bulan, berat badan seragam 20-25 gram. Dibagi 4 kelompok yaitu kelompok 1 diberi benzopirene per oral dosis 8 mg/kg BB 2 kali seminggu disebut BP, kelompok 2 diberi benzopirena seperti kelompok 1 setelah satu jam diberi ekstrak teh hitam, per oral dosis 100 mg/kg BB disebut BP + t<sub>1</sub>, kelompok 3 sama seperti kelompok 2 namun dosis ekstrak teh hitam 80 mg/kg BB disebut BP + t<sub>2</sub> kelompok 4 adalah kelompok kontrol hanya diberi aqua. Semua kelompok perlakuan diaklimatisasi sampai 12 minggu kemudian dibiopsi jaringan mukosa rongga mulut dan diperiksa menggunakan metode histokimia aldehyde fucshin, diastase PAS, hematoksilin eosin.

Hasil penelitian pada kelompok yang diberi benzopirena dan ekstrak teh hitam dosis 100 mg/kg BB disebut BP + t<sub>1</sub> terjadi peningkatan makrofag aktif dengan mean 2,2273 lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok BP + t<sub>2</sub> mean 2,0817 maupun kelompok BP mean 1,0712. Peningkatan sel plasma aktif terjadi pada kelompok BP + t<sub>1</sub> dengan mean 1,5103, lebih tinggi dibanding BP + t<sub>2</sub> yaitu mean 1,4746 maupun BP dengan mean 0,8290. Penghambatan progresivitas tumor

ditunjukkan dengan peningkatan nekrosis sel kanker terutama pada BP + t<sub>2</sub> (mean 1,6905), kemudian BP + t<sub>1</sub> (mean 1,5560) dan BP (mean 1,2748). Penurunan jumlah mitosis sel kanker terutama pada BP + t<sub>1</sub> (mean 0,8798). Pengecilan diameter makroskopik tumor pada BP + t<sub>1</sub> dengan mean 0,2322.

Data penelitian respons imun dan progresivitas tumor dianalisis dengan multivariat analisis of varians (manova). Untuk melihat kecenderungan hubungan antara progresivitas tumor dengan ketahanan imun seluler digunakan *trend eksponensial*. Kesimpulan penelitian ini bahwa ekstrak teh hitam dapat meningkatkan ketahanan imunologik seluler sehingga mampu menghambat progresivitas tumor mukosa mencit yang terpapar benzopirene. Penelitian ini diharapkan ekstrak teh hitam dapat dijadikan sebagai imunomodulator dan antikarsinogen.

## ABSTRACT

The objective of this study was to reveal the influence of black tea extract on the increase of cellular immunologic response as inhibitor of tumor progressiveness in oral cavity mucosa of mice exposed to Benzo(a)pyrene. Samples were healthy male mice of 1-2 months old, with 20-25 gram BW. They were divided into 4 groups: Group 1 (BP) with benzo(a)pyrene of 8 mg/kg BW per oral twice a week; Group 2 (BP+t<sub>1</sub>) with benzo(a)pyrene of 8 mg/kg BW and black tea extract of 100 mg/kg BW per oral; Group 3 (BP+t<sub>2</sub>), similar to Group 2 but with black tea extract of 80 mg/kg BW; and Group 4 as control group, to which aqua was given. Results showed that there was an increase in cellular immunologic resistance. Active macrophage and active plasma cells variables in BP+t<sub>1</sub> group were higher than that in BP+t<sub>2</sub> and BP groups. The decrease of tumor progressiveness with variable of cancer cell necrosis occurred mostly in BP+t<sub>2</sub> group, the decrease of cancer cell mitosis occurred mostly in BP+t<sub>1</sub> group, while the reduction of tumor macroscopic diameter occurred mostly in BP+t<sub>1</sub> group. It can be concluded that black tea extract can increase cellular immunologic response so that it may inhibit tumor progressiveness in oral cavity mucosa of mice exposed to Benzo(a)pyrene.

**Key words :** *Benzo(a)pyrene, Black tea Extract, cellular immune response, oral mucosa, tumor*



## DAFTAR ISI

BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan masalah .....	5
1.3 Tujuan .....	5
1.3.1 Tujuan umum .....	5
1.3.2 Tujuan khusus .....	5
1.4 Manfaat .....	6
BAB 2 Tinjauan pustaka .....	7
2.1 Sistem imunitas tubuh .....	7
2.1.1 Respons imunolok non spesifik .....	7
2.1.2 Respons imunologik spesifik .....	8
2.2 Sistem imunitas tumor .....	9
2.2.1 Makrofag .....	10
2.2.2 Sel plasma .....	13
2.3 Sistem imunitas mencit .....	16
2.4 Mukosa rongga mulut .....	17
2.5 Kanker .....	18
2.5.1 Batasan .....	18
2.5.2 Tata nama .....	18
2.5.3 Progresivitas pertumbuhan tumor .....	18
2.6 Karsinogenesis .....	20
2.7 Mekanisme karsinogen kimia .....	22
2.8 Aktivitas metabolit benzopirene .....	25
2.9 Tanaman teh .....	27
2.9.1 Teh hitam .....	28
2.9.2 Bioaktivitas .....	31

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL .....	33
3.1 Bagan kerangka konseptual .....	34
3.2 Keterangan kerangka konseptual .....	34
3.3 Hipotesis .....	35
BAB 4 METODE PENELITIAN .....	36
4.1 Rancangan penelitian .....	36
4.2 Populasi penelitian .....	36
4.3 Besar sampel .....	36
4.4 Definisi operasional variabel.....	38
4.5 Klasifikasi dan definsi variabel penelitian.....	39
4.6 Bahan penelitian .....	41
4.7 Alat penelitian .....	42
4.8 Kelompok perlakuan .....	43
4.9 Unit analisis .....	44
4.10 Waktu dan tempat penelitian .....	45
4.11 Prosedur kerja .....	45
4.12 Analisis data .....	48
BAB 5 HASIL DAN ANALISIS DATA PENELITIAN .....	51
5.1 Respons imun .....	51
5.2 Progresivitas tumor .....	54
BAB 6 PEMBAHASAN .....	64

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN .....	74
7.1 Kesimpulan .....	74
7.2 Saran .....	74
DAFTAR PUSTAKA .....	75
DAFTAR LAMPIRAN	
DAFTAR GAMBAR	
DAFTAR TABEL	

## DAFTAR GAMBAR

Gambar morfologi makrofag .....	13
Gambar morfologi sel plasma .....	15
Gambar morfologi epitel mukosa .....	17
Bagan mekanisme karsinogen kimia .....	24
Ikatan kovalen senyawa dihidriol epoksida B(a)P-DNA .....	26
Gambar 5.1.1 Grafik pengaruh pemberian ETH (ekstrak teh hitam) terhadap aktivasi sel makrofag rongga mulut yang terpapar B(a)P.....	53
Gambar 5.1.2 Grafik pengaruh pemberian ETH terhadap aktivasi sel plasma rongga mulut mencit yang terpapar B(a)P.....	53
Gambar 5.2.1 Grafik pengaruh pemberian ETH terhadap nekrosis sel kanker pada mencit yang terpapar B(a)P .....	56
Gambar 5.2.2 Grafik pengaruh pemberian ETH terhadap mitosis sel kanker pada mencit yang terpapar B(a)P .....	56
Gambar 5.2.3 Grafik pengaruh pemberian ETH terhadap diameter kanker pada mencit yang terpapar B(a)P .....	57
Gambar 5.3 Hubungan respon imun dengan progresivitas tumor ada kecenderungan semakin baik respon imun, progresivitas tumor menurun .....	57

Sel makrofag aktif (panah) diantara sel tumor tampak granul pinositik sitoplasmik meningkat berwarna kecoklatan, pulasan Adehyde Fuschin Methode dengan pembesaran 400x .....58

Sel plasma aktif (panah) diantara sel tumor tampak sitoplasmik berwarna merah magenta, pulasan D-PAS, dengan pembesaran 400x.....59

Sel kanker yang mengalami Nekrosis (panah) pada Fibro Sarkoma, pulasan HE, dengan pembesaran 400x ..... 60

Sel kanker yang mengalami Mitosis (panah) pada malignant Fibro Histiocytoma, pulasan HE, dengan pembesaran 400x.....61

Karsinoma sel skuamus, pada mukosa rongga mulut mencit. Terpapar B(a)P dan pemberian ETH dosis 100 mg/kg BB, pulasan HE, dengan pembesaran 400x.....62

Sel kanker pada Rhabdomyo Sarkoma rongga mulut mencit yang terpapar B(a)P dan pemberian ETH dosis 80 mg/kg BB adanya striated muscle, pulasan PTAH, dengan pembesaran 400x ..... 63

**DAFTAR TABEL**

Tabel 5.1 : Diskripsi variabel respons imun pada mencit strain Balb C yang terpapar B(a)P dan diberikan ekstrak teh hitam .....51

Tabel 5.1.2 : Multivariat analisis respons imun antara kelompok kontrol dan perlakuan.....52

Tabel 5.2 : Diskripsi variabel progresivitas tumor pada mencit strain balb C yang terpapar B(a)P dan diberikan ETH..... 54

Tabel 5.2.1 : Multivariat analisis varian progresivitas tumor antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ..... 55

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	:	.....	83
Lampiran 2	:	Deskripsi respon imun dan cancer pada ... (Pemberian Placebo, Bp, BP+t <sub>1</sub> , Bp+t <sub>2</sub> )	84
Lampiran 3	:	Deskripsi respon imun dan cancer pada ... (Pemberian Placebo, Bp, BP+t <sub>1</sub> , Bp+t <sub>2</sub> )	85
Lampiran 4	:	Perbedaan respon imun pada perlakuan ... (Pemberian Placebo, Bp, BP+t <sub>1</sub> , Bp+t <sub>2</sub> )	86
Lampiran 5	:	Analysis of Variance .....	87
Lampiran 6	:	Perbedaan respon imun dan cancer pada ... (Pemberian Placebo, Bp, BP+t <sub>1</sub> , Bp+t <sub>2</sub> )	88
Lampiran 7	:	Perbedaan cancer pada perlakuan ..... (Pemberian Placebo, Bp, BP+t <sub>1</sub> , Bp+t <sub>2</sub> )	89
Lampiran 8	:	Analysis of Variance .....	90
Lampiran 9	:	Perbedaan cancer pada perlakuan ..... (Pemberian Placebo, Bp, BP+t <sub>1</sub> , Bp+t <sub>2</sub> )	91
Lampiran 10	:	Pemulasan D-PAS (Diastase Periodic Acid Schiff) .....	92
Lampiran 11	:	Pemulasan Aldehyde Fuchsin Methode menurut Gomeri .....	94,
Lampiran 12	:	Pemulasan Hematoksilin Eosin .....	95

# BAB 1



# BAB 1

## PENDAHULUAN



### 1.1 Latar Belakang

Benzopirene atau B(a)P adalah senyawa polisiklik aromatik hidrokarbon yang bersifat karsinogenik dan paling sering menyebabkan kanker (Li, 1996; Kim, 1998 dan Cotran, 1999). Substansi ini banyak ditemukan di udara, asap rokok, asap kendaraan, makanan yang dibakar dan sisa pembakaran organik (Hardyn, 1992). B(a)P ini menghasilkan metabolit reaktif yang dapat berikatan secara kovalen dengan DNA sehingga terjadi mutasi genetik (Suryohudoyo, 1993; Li, 1996). Bila mutasi genetik mengenai protoonkogen maka dapat berubah menjadi onkogen (Constantinides, 1994; Mendelson, 1995 ;Putra 1997). Mengingat besarnya resiko terpapar B(a)P dan insidens kanker di Indonesia masih tinggi, maka diperlukan usaha pencegahan melalui penelitian maupun pemanfaatan bahan baku alam yang bersifat antikarsinogenik serta dapat memperbaiki sistem ketahanan imunologik tubuh. Bila sistem ketahanan imunologik baik maka perkembangan sel kanker dapat dihambat (Lehner, 1992; Dalglish, 1995; Kumar, 1997; Putra 1997). Sesuai hasil penemuan Yoshino dkk (1994) dan Chen bersama Yen (1997) bahwa di dalam teh hitam (Camelia Sinensis) terkandung substansi aktif Theaflavin yang ber-

sifat antimutagenik dan mampu meningkatkan aktivitas sel B. Namun sampai sejauh ini belum terbukti pengaruh ekstrak teh hitam terhadap perbaikan sistem ketahanan imunologik mencit yang terpapar B(a)P melalui rongga mulut agar dapat menghambat progresivitas kanker.

Teh hitam secara tradisional sudah digunakan secara turun menurun. Biasanya masyarakat mengkonsumsi dalam bentuk seduhan teh dan digunakan sebagai minuman setiap hari. Selain memberikan kesegaran, teh hitam juga mudah di peroleh dan harganya relatif terjangkau. Khasiat teh hitam telah diyakini oleh masyarakat sebagai obat tradisional seperti misalnya antidiare, penyembuhan infeksi kulit, meningkatkan stamina (Junzhi, 1991). Hal serupa dilaporan Zhiozaki (1997) bahwa ekstrak teh hitam dapat mencegah alergi tipe 1 (satu). Keadaan ini diasumsikan bahwa teh hitam dapat memperbaiki sistem imun. Sistem imunologik yang baik dapat meningkatkan aktivitas sel imunokompeten terhadap zat asing di dalam tubuh. Sel kanker di dalam tubuh juga merupakan zat asing karena pada permukaannya di ekspresikan protein *non self* atau asing. Bila sistem imunologik tubuh baik maka perkembangan sel kanker ini dapat dihambat. Mengingat risiko terpapar B(a)P dan insidens kanker masih cukup tinggi maka dengan diketemukan khasiat ekstrak teh hitam sebagai zat yang mampu memperbaiki sistem ketahanan imunologik maka dapat memperlambat progresivitas kanker.

Pada awal mulanya diketemukan teh di China tahun 780, dikenal sebagai bahan obat kemudian baru dikonsumsi sebagai minuman (Beng, 1996). Penulis dari Jepang yang pertama memberikan laporan ilmiah tentang peranan kesehatan, bahwa teh adalah obat istimewa yang memiliki kekuatan mistik dan dapat memperpanjang hidup seseorang (Beng, 1996). Kemudian penelitian terhadap khasiat teh semakin berkembang, hal ini dilaporkan oleh Yayasan Kesehatan Jepang bahwa penduduk dengan kebiasaan minuman teh mempunyai kecenderungan menderita kanker perut lebih sedikit dibanding yang bukan mengkonsumsi teh (Tsushinsha, 1982) Sejak itu dengan cepat penelitian terhadap khasiat teh berkembang, bahkan 80% penduduk berbagai negara mengkonsumsi teh hitam, terutama di Benua Asia (Yang dan Wang, 1996; Muktar dan Ahmad, 1999). Di dalam teh hitam terkandung zat aktif *theaflavin* yang mempunyai efek antioksidatif dan antimutagenik (Shiraki, 1994). Chen dan Yen (1997) melaporkan bahwa mekanisme antimutagenik ekstrak teh hitam dengan cara mengurangi atau menghambat terbentuknya metabolit mutagenik B(a)P. Berikutnya penelitian dilakukan oleh Chung FL (1999) bahwa ekstrak teh hitam dapat mencegah karsinogenesis pada paru mencit yang diinduksi nikotin tembakau dengan cara menghambat efek mutagenik terhadap DNA. Sebegitu jauh sebagian besar adalah laporan mengenai mekanisme antikanker saja, dan sebagian kecil yang melaporkan efek terhadap sistem imunologik tanpa.

ada kaitannya dengan kanker. Dengan meneliti dan menemukan mekanisme sistem imunologik terutama kaitannya dengan pencegahan kanker pada penelitian ini, diharapkan dapat dikembangkan potensi teh hitam baik sebagai imunoterapi maupun kemoterapi.

Berdasarkan permasalahan di atas, maka dalam mencari solusi dikemukakan suatu konsep yang dilandasi beberapa teori. B(a)P merupakan substansi karsinogen sehingga dapat menyebabkan terjadinya kanker. Metabolit karsinogenik B(a)P dapat berikatan dengan DNA dan menyebabkan mutasi gen, selain itu mengakibatkan gangguan sistem ketahanan imunologik. Risiko tinggi terpapar B(a)P antara lain melalui rongga mulut, maka insidens dan progresivitas kanker rongga mulut akan meningkat. Dengan diketemukan senyawa aktif di dalam ekstrak teh hitam serta khasiatnya sebagai penghambat aktivitas metabolit B(a)P, antioksidan maupun pemicu diferensiasi sel B maka didapatkan konsep sebagai berikut : ekstrak teh hitam dapat memperbaiki sistem ketahanan imunologik dan sebagai anti mutagenik sehingga menghambat progresivitas pertumbuhan tumor serta menurunkan insidens kanker khususnya di rongga mulut.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah ada pengaruh pemberian ekstrak teh hitam terhadap sistem ketahanan imunologik seluler rongga mulut mencit (*mus musculus*) strain Balb C yang terpapar B(a)P ?
2. Apakah ada pengaruh pemberian ekstrak teh hitam terhadap progresivitas tumor rongga mulut mencit (*mus musculus*) strain Balb C yang terpapar B(a)P ?

## 1.3 Tujuan

### 1.3.1 Tujuan umum

Menjelaskan bioaktivitas imunomodulator pemberian ekstrak teh hitam terhadap sistem ketahanan imunologik dalam upaya penghambatan pertumbuhan tumor rongga mulut mencit (*mus musculus*) strain Balb C yang terpapar benzopirene.

### 1.3.2 Tujuan khusus

1. Membuktikan pengaruh pemberian ekstrak teh hitam terhadap peningkatan aktivitas morfofungsilogik sel makrofag dan sel plasma pada rongga mulut mencit (*mus musculus*) strain Balb C yang terpapar benzopirene
2. Membuktikan pengaruh pemberian ekstrak teh hitam terhadap penghambatan progresivitas tumor rongga

mulut mencit (*mus musculus*) strain Balb C yang terpapar benzopirene, melalui variabel nekrosis sel tumor, mitosis sel tumor dan diameter tumor.

#### 1.4 Manfaat

1. Penelitian ini diharapkan mampu memberikan penjelasan ilmiah mengungkap mekanisme imunopatobiologi dari pengaruh penggunaan ekstrak teh hitam terhadap sistem ketahanan imunologik mukosa rongga mulut sehingga mampu menghambat pertumbuhan tumor pada mencit (*mus musculus*) strain Balb C.
2. Dapat dijadikan dasar pengembangan lebih lanjut penggunaan teh hitam sebagai imunomodulator dan antikarsinogen terutama bagi yang sering terpapar benzopirene seperti perokok, penggemar makanan yang dibakar.
3. Dapat dikembangkan pemanfaatan teh hitam sebagai bahan imunoterapi maupun kemoterapi.

# BAB 2

## BAB 2

### STUDI PUSTAKA

#### 2.1 Sistem Imunitas Tubuh

Di dalam tubuh terdapat sistim limforetikuler yang melaksanakan fungsi imunitas. Sistem ini merupakan jaringan atau kumpulan sel yang letaknya tersebar di seluruh tubuh misalnya dalam sumsum tulang, kelenjar limfe, limpa, timus juga terdapat dalam sistem respiratorik, gastrointestinal dan organ yang lain. Bila sistem imun terdapat rangsangan maka ada 2 jenis respons yang terjadi yaitu respons imunologik nonspesifik & respons imunologik spesifik:

##### 2.1.1 Respons Imunologik Nonspesifik

Fagositasi oleh makrofag, neutrofil, eosinofil dan monosit terhadap imunogen yang masuk adalah upaya tubuh untuk mempertahankan diri secara nonspesifik. Fagosit untuk menuju imunogen sasaran dibantu oleh komplemen yang mengeluarkan faktor leukotaktik, dan opsonisasi oleh komponen C3b. Aktivasi komplemen ini memudahkan makrofag dan neutrofil mengenali imunogen, oleh karena kedua sel ini mempunyai reseptor untuk C3b. Proses fagositosis juga memerlukan imunoglobulin (IgG) sehingga mudah dikenali oleh reseptor Fc yang terdapat pada permukaan makrofag. Respons



imunologik nonspesifik lainnya adalah reaksi inflamasi akibat dilepaskannya mediator tertentu oleh beberapa jenis sel, seperti basofil yang melepas histamin dan trombosit yang melepas vasoaktif amin.

### 2.1.2 Respons Imunologik Spesifik

Aktivasi *antigen presenting cell* (APC) memproses awal antigen sedemikian rupa sehingga dapat menimbulkan interaksi dengan berbagai sel dalam sistem imun. Dengan adanya rangsangan dari antigen ini maka sel dalam sistem imun akan berproliferasi dan berdiferensiasi hingga menjadi sel yang memiliki kompetensi imunologik tertentu. Ada 3 macam respons imunologik spesifik, yaitu :

1. Respons imunologik seluler. Berupa proliferasi dan diferensiasi dari limfosit T menjadi subpopulasi sel T seperti sel T-helper, sel T-sitotoksik/sel T-supresor dengan fungsi imunologik masing-masing.
2. Respons imunologik humoral. Berupa proliferasi dan perubahan populasi sel B menjadi sel plasma yang dapat mensekresi imunoglobulin/antibodi ke dalam sirkulasi. Antibodi akan berikatan dengan antigen yang masuk untuk membentuk kompleks yang mengaktivasi sistem komplemen, sehingga terjadi penghancuran dari kompleks tersebut.

3. Interaksi antara respons imunologik seluler dan humoral dikenal sebagai *Antibody dependent cellular cytotoxicity* atau ADCC merupakan salah satu contoh dari respons imunologik (Roitt, 1996; Kumar, 1997).

## 2.2 Sistem Imunitas Tumor

Berbagai perubahan atau gangguan genetik pada kanker, kemungkinan dihasilkan pula ekspresi antigen pada permukaan sel kanker yang *non self* atau asing sehingga pengenalan sel kanker melalui sistem imun kemungkinan dapat eliminasi sel kanker. Konsep tersebut kemudian diyakini sebagai *immune surveillance* yang dapat mengenali dan menghancurkan antigen nonself sel kanker (Thomas & Burnet dikutip dari Cotrans, 1999). Antigen kanker pada manusia yang dapat menyebabkan respons imun diklasifikasikan menjadi 2 kategori yaitu (1) Tumor-Spesific antigens (TSAs) hanya ditemukan pada sel kanker, (2) Tumor Associated antigens (TAAs) didapatkan baik pada sel kanker maupun beberapa sel normal. Mekanisme efektor antikanker dapat melalui baik respons imun seluler maupun humoral. Sel imunokompeten yang berperan dalam mekanisme antikanker antara lain makrofag, sel plasma, Limfosit T, sel NK.

### 2.2.1 Makrofag

#### 1. Konsep Makrofag

Pada manusia dan hewan vertebrata dikenal adanya fagositosis yaitu kegiatan sel berupa pemakanan atau perusakan partikel asing yang masuk ke dalam tubuh. Sel fagositik mononuklear atau makrofag dan fagositik polimorfonuklear yaitu netrofil dan eosinofil. Kemampuan fagositosis oleh sel makrofag pertama kali diperkenalkan oleh Metchnikoff (dikutip dari Subowo, 1993).

#### 2. Asal makrofag

Makrofag di dalam jaringan umumnya berasal dari monosit darah. Awal mulanya *stem cells* di dalam sumsum tulang mengadakan proliferasi dan masuk ke dalam sirkulasi darah setelah mengalami periode maturasi mulai dari monoblas, promonosit sampai menjadi monosit (Roitt, 1996; Stites, 1997). Monosit berada dalam darah selama 24 jam dan kemudian bermigrasi ke dalam berbagai jaringan dan mengalami transformasi menjadi makrofag. Makrofag tersebar di berbagai jaringan di antaranya terdapat di paru, hati, peritoneum, limpa, kelenjar getah bening sumsum tulang. Pada sistem syaraf disebut mikroglia dan di dalam jaringan tulang disebut osteoklas (Bellanti 1993). Dapat

berubah menjadi sel raksasa dan sel epiteloid bila ada antigen yang sukar difagositir seperti bahan minyak dan mineral.

### 3. Morfologik :

Bentuk inti seperti sepatu kuda. Sitoplasma berisi granula azurofilik. Membran sel bergerigi dan terdapat pseudopodia. Pada pemeriksaan ultra struktur terdapat kerutan membran golgi, mitokondria, ribosom dan vesikula lisosom yang berperan penting dalam degradasi intraseluler.

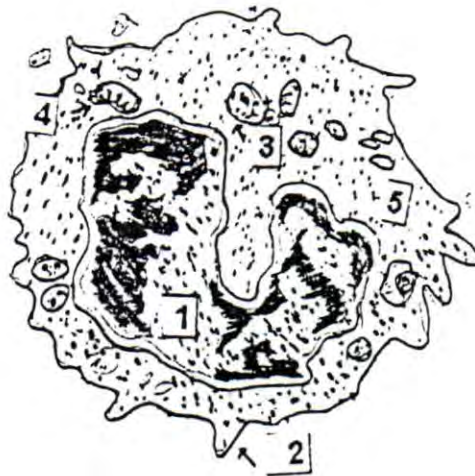
### 4. Makrofag Aktif

Makrofag di dalam jaringan dapat diaktifkan melalui berbagai cara antara lain endotoksin, antibodi dan produk limfosit atau limfokin. Berbagai limfokin yang dapat mengaktifkan makrofag ialah dari sel T seperti *makrophag activating faktor* (MAF), IFN gamma, IL2, GM-CSF (*granulocyte makrophag colony stimulating factor*), *MIF* (*makrofag migration inhibiting factor*), TNF alfa, dan *makrofag arming factor* yang akan menginduksi peningkatan efek sitolisis makrofag untuk melawan sel tumor (Roitt, 1996). Makrofag yang aktif akan mengalami perubahan morfologis, metabolisme dan fungsi. Dari makrofag juga diekspresikan reseptor

Fc seperti halnya pada sel NK kemudian berikatan dengan antibodi untuk membunuh kanker (Abbas dkk, 1994; Roitt, 1996; Cotran, 1999).

- a. Perubahan morfologis : ukuran sel membesar, membran bergerigi, peningkatan pseudopodia merupakan tonjolan mikrovili yang memanjang, peningkatan vesikula pinositik yang merupakan gambaran peningkatan jumlah dan ukuran granula, lisosom, sitoplasma lisosom dan mitokondria berisi enzim hidrolitik (Stites, 1997).
- b. Perubahan metabolisme : peningkatan metabolisme glukosa dan respirasi serta pelepasan bahan pirogen, prostaglandin, interferon, faktor sitolitik (Bellanti, 1993). Makrofag aktif mempunyai cadangan ATP lebih banyak.
- c. Perubahan fungsi : Fungsi fagositosis & kemampuan membunuh mikroba meningkat. Setelah aktivasi berbagai produk biologik aktif dan sekresi makrofag yang akan merusak jaringan dan meningkatkan fibrosis. Peningkatan fungsi efektor terhadap sel tumor dengan cara sekresi bahan sitolitik, produk yang dikeluarkan antara lain nitric oxyde, dan toxid Oxygen Metabolites yang pada level tinggi dapat

membatasi replikasi bakteri, virus, termasuk sel tumor dan TNF alfa yang bersifat sitolitik (Cotran, 1999).



Keterangan :

1. Inti sel
2. Pseudopodia
3. Vesikula pinositik
4. Mitokondria
5. Sitoplasma lisosomal

Gambar : Makrofag (Abbas, 1994);

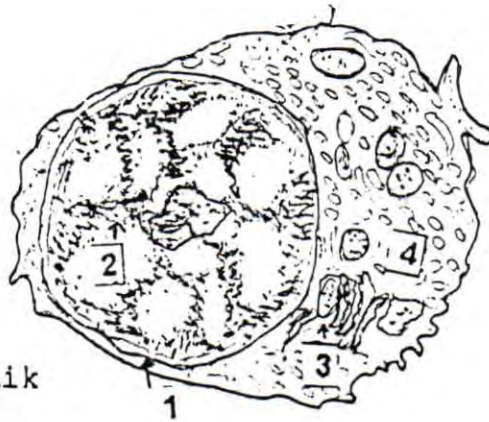
### 2.2.2 Sel Plasma

Adalah sel aktif penghasil antibodi berasal dari diferensiasi sel B. Sel ini hanya ditemukan di organ limfoid dan pada berbagai lokasi dimana terjadi respons imun. Pada keadaan normal tidak didapatkan baik disirkulasi darah, maupun kelenjar limfe.

1. Morfologik mempunyai gambaran khas yaitu inti eksentrik; kromatin tersusun seperti roda pedati dengan sitoplasma yang di dalamnya berisi penuh *rough endo-plasmic reticulum* dimana merupakan tempat antibodi dan berbagai sekresi protein membran disintesa, juga golgi kompleks yang besar. Sel plasma diyakini sebagai diferensiasi terminal sel B dan mempunyai fungsi penting dalam sintesis serta sekresi molekul antibodi atau imunoglobulin (Abbas, 1994).
2. Peranan terhadap penghancuran sel tumor melalui 2 jalan yaitu :
  - a. Aktivasi sistem komplemen dengan cara opsonisasi oleh C3b kemudian diikat antibodi yang melekat pada sel fagosit untuk membunuh sel kanker.
  - b. Induksi ADCC oleh sel NK dan makrofag dengan cara Imunoglobulin atau antibodi yang disekresikan oleh sel plasma akan diikat oleh Fc reseptor pada sel NK, kemudian sel NK melisiskan sel tumor (Abbas, 1994; Roitt, 1996; Cotran, 1999).

Keterangan :

1. Inti sel
2. Kromatin inti sel
3. Retikulum endoplasmik
4. Sitoplasma  
(produk imunoglobulin)



Gambar sel plasma (Abbas, 1994)

2.2.3 Limfosit T sitotoksik pada mulanya peranan terhadap kanker manusia dikaitkan dengan virus-associated tumor. Potensi antikanker limfosit T sitotoksik ini terjadi akibat aktivasi interleukin-2 serta pengenalan antigen kanker bersama MHC1.

2.2.4 *Natural Killer Cells* atau sel NK adalah limfosit yang dapat menghancurkan sel kanker tanpa sensitisasi lebih dahulu. Sel NK ini merupakan pertahanan garis depan terhadap berbagai kanker, oleh karena dapat secara langsung membunuh sel tumor.



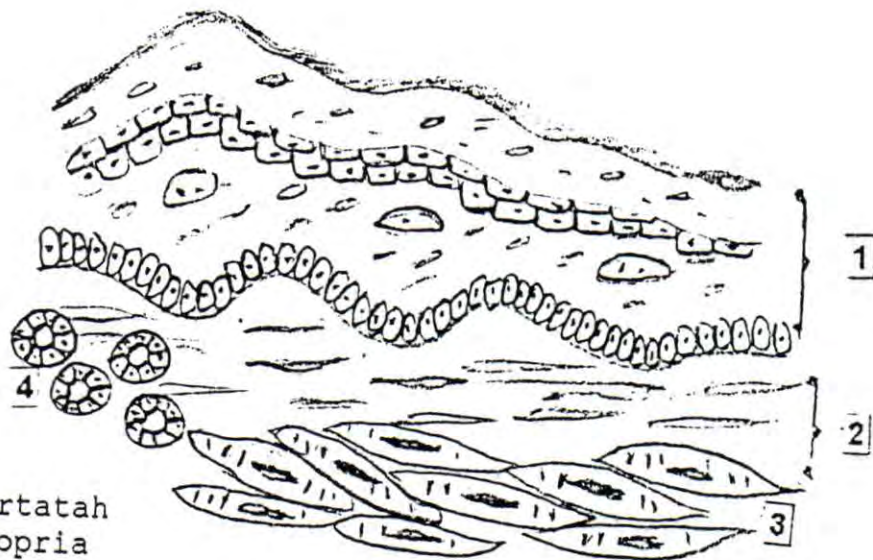
### 2.3 Sistem Imunitas Mencit

Mencit digunakan sebagai hewan percobaan karena 60-80% hewan percobaan untuk uji biologik menggunakan mencit terutama yang berasal dari galur Balb C, dengan alasan :

1. Tubuh kecil, sehingga tidak banyak memerlukan ruang pemeliharaan dan konsumsi makanan
2. Mudah beradaptasi dengan kandang dan lingkungan sekitar
3. Harganya murah
4. Sistem imun mencit lebih banyak diketahui dibandingkan dengan hewan percobaan lain (Maat, 1995). Sejak konsep seluler ditemukan tahun 1966 oleh Claman dan kawan-kawan menemukan konsep seluler yaitu untuk membedakan subpopulasi dari sel T pada mencit, dan saat itu pula mencit digunakan sebagai model untuk meneliti secara detail sistem imun seluler pada manusia (Maat, 1995). Antigen permukaan dari sel limfosit yang pertama kali ditemukan adalah antigen *Theta* dan kemudian dikenal dengan nama Thy-1 yang hanya didapatkan pada sel T. Sedangkan antigen yang terdapat pada semua sel limfosit adalah Ly, Ly t pada sel T dan Ly b pada sel B dan antigen ini yang digunakan untuk membedakan fungsi dari subpopulasi sel limfosit.

## 2.4 Mukosa Rongga Mulut

Rongga mulut dilapisi oleh membran mukosa yang berkesinambungan dengan kulit, pada bagian luar berbatasan dengan bibir dan bagian dalam dengan mukosa faringeal. Epitel mukosa rongga mulut meliputi bibir, vestibulum, gingiva, pipi, palatum. Dasar mulut dan sebagian lidah (Schroeder, 1991).



Keterangan :

1. Epitel bertatah
2. Lamina propria
3. Otot bergaris
4. Kelenjar seromukus

Gambar Epitel mukosa (Shcroeder, 1991)

Epitel mukosa rongga mulut terdiri dari berbagai lapisan yang saling berhubungan antara lain stratum corneum, stratum granulosum, stratum spinosum, stratum basale. *Stratum basale* menempatkan diri pada lamina basal yang membagi epitel dari jaringan ikat di bawahnya. Sel basal aktif membelah dan mengganti sel epitel dengan yang baru.

## 2.5 Kanker

### 2.5.1 Batasan

Kanker merupakan istilah untuk menyatakan neoplasma ganas. Neoplasma : adalah pertumbuhan baru abnormal, tidak terkendali dan tetap berkembang walaupun penyebabnya telah dihilangkan. Tumor adalah istilah untuk menyebut benjolan neoplasma. Oleh karena itu Neoplasma ganas dapat disebut juga tumor ganas atau kanker. Kanker mempunyai karakteristik sebagai berikut : Anaplasia, pertumbuhan cepat, invasi ke jaringan sekitar dan metastasis (Cotran, 1999).

### 2.5.2 Tata Nama

Tata nama pada kanker didasarkan pada sel parenkimnya. Sarkoma adalah neoplasma ganas yang berasal dari jaringan mesenkimal atau turunannya. Karsinoma adalah neoplasma ganas yang berasal dari epitel. Adenokarsinoma adalah neoplasma ganas yang berasal dari epitel yang membentuk pola kelenjar.

### 2.5.3 Progresivitas pertumbuhan tumor

Progresivitas tumor dan kecepatan tumbuh tumor ditentukan oleh kelebihan sel yang berproliferasi dibandingkan sel yang hilang. Perkembangan dari lesi preneoplastik menjadi tumor jinak sampai kanker invasif disebut sebagai tumor *progression* atau progresivitas tumor. Pertumbuhan tumor dipengaruhi oleh 3 faktor utama yaitu : kinetik per-

tumbuhan sel tumor, tumor angiogenesis, dan tumor *progression* serta heterogenitas.

1. Kinetik pertumbuhan sel tumor. Meliputi 3 antara lain *doubling time*, fraksi pertumbuhan sel tumor dalam keadaan replikasi. Keseimbangan antara sel yang tumbuh dan yang mati (Cotran, 1999).
2. Tumor angiogenesis : Pertumbuhan tumor tergantung pada suplai darah, tumor tidak bisa membesar lebih dari 1 mm-2 mm bila tidak ada vaskularisasi. Tidak membentuk angiogenesis sampai beberapa bulan atau beberapa tahun (Cotran, 1999).
3. Tumor *progression*. Pengertian tumor *progression* adalah progresivitas dari kelainan preneoplastik menjadi tumor jinak sampai terjadi kanker yang invasif.

#### 2.5.4 Mitosis

Mitosis adalah perubahan sel dimana bahan inti terbagi sedemikian rupa sehingga dari satu sel dihasilkan dua buah sel anakan yang masing-masing memiliki sifat genetik sama (Suryo, 1994).

#### 2.5.5 Kematian sel

Ada 2 bentuk. Kematian sel morfologik yaitu nekrosis dan apoptosis.

1. Nekrosis adalah perubahan morfologis menyangkut sel yang mati dalam jaringan hidup sebagai akibat degradasi progresif oleh enzim lisosom karena terjejas letal.
2. Apoptosis adalah kematian sel yang terprogram karena aktivasi enzim *nuclear endonuclease endogen* biasanya terjadi pada proses fisiologik, namun juga dapat terjadi pada keadaan patologik.

## 2.6 Karsinogenesis

Karsinogenesis dapat diartikan sebagai proses terjadinya kanker. Mekanisme karsinogenesis diyakini terjadi secara multi hits, karena sebagai hasil dari beberapa rangkai penyebab yang berurutan (Mendelson, 1995; Putra, 1997 dan Cotran 1999). Tahapan karsinogenesis dibagi menjadi 3 tahap yaitu inisiasi, promosi dan progresi.

Mekanisme proses karsinogenesis sampai saat ini masih selalu dipelajari karena mekanisme yang pasti mengenai inisiasi kanker dan promosinya masih belum dipahami, namun teori yang lebih sesuai dan mendekati yaitu teori mutasi sel somatik, selain itu fenomena epigenetik sangat mungkin juga berperan dalam proses karsinogenesis.

Penelitian karsinogenesis kimia telah banyak dilakukan dan telah dibuktikan bahwa kanker yang berasal dari

karsinogen kimia adalah suatu proses yang sangat kompleks. Perubahan-perubahan patologik dan biokimia yang terjadi pada induksi kanker masih terus dipelajari (Pudjiastuti, 1997). Pada tahap inisiasi, promosi dan progresif diyakini bahwa mutasi sebagai penyebab yang utama. Mutasi sel yang terbentuk atau mutan mengalami perubahan gen pada protein pengatur pertumbuhan atau proliferasi dan differensiasi. apabila mutasi terjadi pada protein gen tertentu maka akan terjadi perubahan fungsi protein tersebut kemungkinan penghambatan proliferasi atau sebaliknya terjadi perangsangan, hal ini tergantung pada mutasi yang terbentuk. Menurut Constantinides (1995) terbentuknya neoplasma oleh karena terjadi perubahan pada 2 sistem gen mengatur DNA yaitu *proliferasi - stimulating gene (proto - oncogene* atau *cell oncogen)* dan *proliferation inhibiting gene (proliferation-supressor gene* atau *cancer supressor gene)*. Hal ini didukung oleh pendapat Mendelson (1995) bahwa timbulnya kanker oleh karena proses akumulasi mutasi secara multi-tahap. Pendapat Kumar (1997) bahwa neoplasma merupakan hasil dari ekspansi klonal satu sel progenitor yang telah mengalami mutasi (monoklonal), terjadinya mutasi genetik dikaitkan dengan agen lingkungan bahan kimia, radiasi dan virus. Menurut Contran (1999) dasar genetik kanker adalah sebagai berikut (1) rusaknya genetik atau mutasi kemungkinan

disebabkan oleh berbagai pengaruh agen lingkungan seperti kimia, radiasi, virus dan faktor yang diturunkan, (2) Tiga klasifikasi gen normal sebagai pengatur antara lain *growth promoting protooncogenes*; *growth inhibiting-cancer suppressor genes* atau *antioncogene* dan gen yang mengatur *programmed cell death* atau apoptosis, (3) selain tiga klasifikasi gen yang disebut diatas, ada pula gen pengatur *repair* terhadap DNA yang rusak, (4) Karsinogenesis merupakan proses yang multistep dan dikaitkan dengan faktor fenotipik maupun genetik.

## 2.7 Mekanisme karsinogen kimia

Pada umumnya bahan karsinogen kimia adalah mutagen, akan tetapi ada juga karsinogen yang bukan mutagen, misalnya ethionin, stiren oksida, natrium azida dan trioasetamina (Pudjiastuti, 1997). Selain itu perubahan yang terjadi pada molekul DNA tidak selalu bersifat mutagenik, dengan kata lain dikatakan bahwa mutasi tunggal saja tidak akan cukup menginisiasi proses terbentuknya tumor. Dengan demikian berarti terjadinya kanker adalah suatu proses yang multi-tahap dimana tahap awalnya adalah interaksi antara karsinogen atau metabolit aktifnya dengan makromolekul sel.

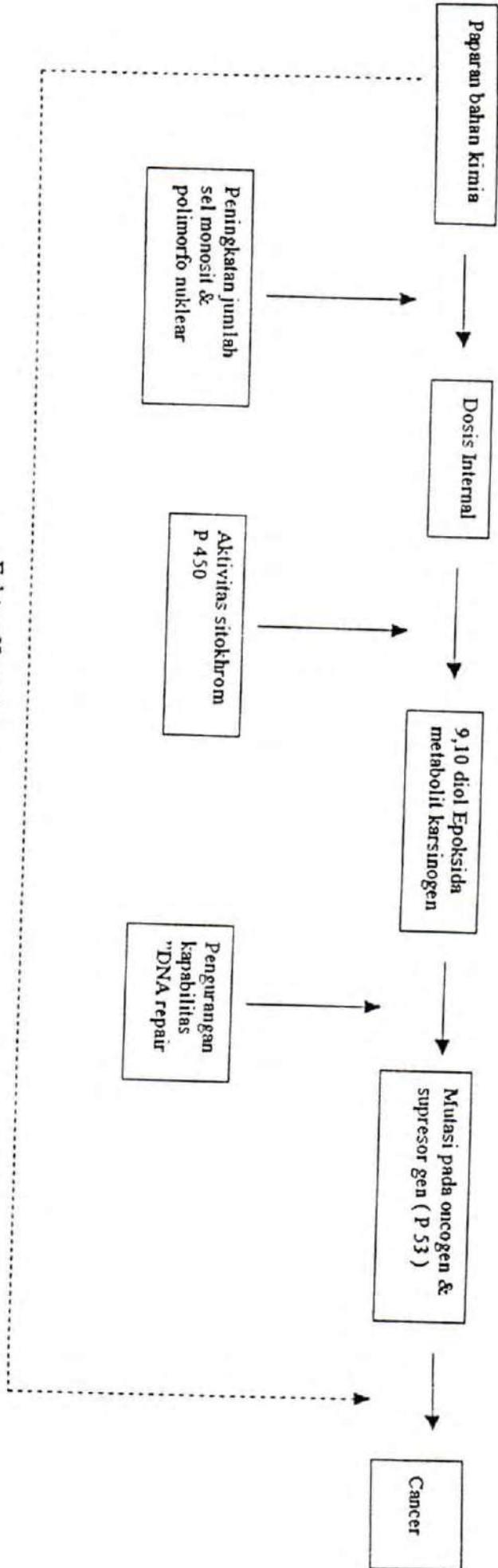
Suatu karsinogen dapat pula mempengaruhi atau merubah respons sel terhadap pengaturan pertumbuhan melalui suatu

efek non genetik atau penurunan efisiensi sistem pengawasan imunologik (Goodman, 1991; Lehner, 1992). Baik mekanisme epigenetik maupun genetik yang berperan dalam berbagai tahap inisiasi dan promosi tumor (Kumar, 1997). Selama ini target tingkat seluler lebih difokuskan pada ikatan antara karsinogen dengan asam nukleat, khususnya DNA (Rasko, 1995). Telah ditemukan bahwa sejumlah karsinogen kimia yang mutagenik mampu mengalkilasi basa-basa DNA pada posisi 0-6 atau N-7 dari guanin. Terjadinya interaksi ikatan kovalen sebanding dengan tingkat karsinogenitasnya artinya makin besar. Dalam beberapa hal, walaupun terjadi alkilasi DNA tetapi tidak menyebabkan terjadinya mutasi, ini disebabkan oleh kemampuan sel untuk mengadakan repairing asam nukleat atau perbaikan DNA yang telah teralkilasi sehingga tidak mengakibatkan salah pasangan atau mispairing antara basa DNA (Pudjiastuti, 1997; Cotran, 1999).





BAGAN MEKANISME KARSINOGEN KIMIA



Faktor Kerentanan

Harris (1991)

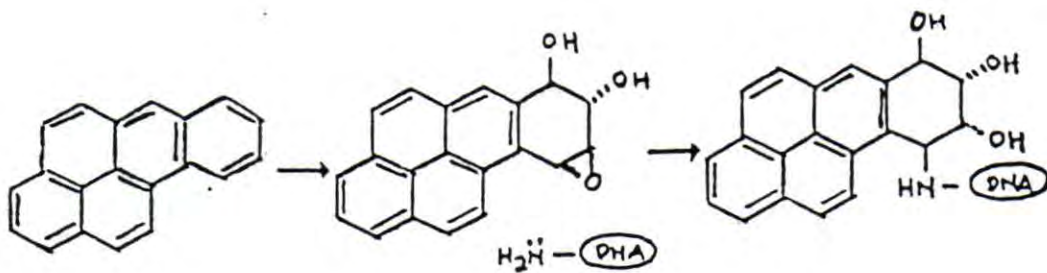
## 2.8 Aktivasi Metabolit Benzopirene atau B(a)P

Benzopirene atau 1,2 Benzopirene disingkat B(a)P adalah senyawa poli hidrokarbon aromatis (PAH) yang terdapat pada batu bara, minyak bumi, asap rokok, gas, udara dan buangan motor serta makanan yang dipanggang atau diasap (Hardyn, 1992). Benzopirene berupa kristal kuning, berbentuk jarum, massa molekul ( $M_r = 252,3$ ) dengan titik lebur  $179-179,3^\circ\text{C}$ . Benzopirene adalah salah satu senyawa yang paling banyak diteliti karena sangat karsinogenik. Terjadinya senyawa polisiklik aromatik hidrokarbon ini diduga karena pembakaran yang tidak sempurna dari bahan bakar fosil melalui proses polimerisasi radikal bebas karena pirolisis.

Benzopirene sendiri sebenarnya prokarsinogenik yaitu suatu bahan yang akan menjadi karsinogen apabila terbentuk suatu senyawa *proximate carcinogen* dan *ultimate carcinogen* dengan adanya aktivitas enzimatik, *Proximate carcinogen* adalah metabolit intermedier, sedangkan *ultimate carcinogen* adalah metabolit akhir yang bersifat karsinogen (Rasko, 1995). Hasil metabolisme benzopirene yang berupa senyawa nontoksik akan dieksresikan melalui urine.

Pada tahap awal, B(a)P di dalam sel mengalami reaksi epoksidasi pada posisi 7,8 oleh mixed-function oxidase (MFO) yang mengandung berbagai bentuk sitokrom P-450 enzim berlokasi pada membran retikulum endoplasma dan DNA inti

sel. Senyawa 7,8 - arenoksida B(a)P akan diubah menjadi senyawa nontoksik apabila menjadi 7 hidroksi B(a)P melalui reaksi non enzimatik. Kemudian berkonjugasi dengan asam difosfoglukoronik (UDPGA) atau sulfat membentuk *glucoronida* dan konjugat sulfat. Senyawa 7,8 - arenoksida B(A)P akan menjadi karsinogen bila terjadi hidrasi oleh enzim epoksida hidrolase menjadi 7,8 - dihidriol, lalu dihidriol dioksidasi lagi oleh enzim *monooksigenase* membentuk *ultimate carcinogen*, yaitu 7,8 - dihidriol 9,10 - epoksida yang merupakan senyawa yang sangat reaktif. Mekanisme karsinogenesis terjadi dengan cara mengikat guanin basa DNA sehingga terjadinya gangguan replikasi DNA akibatnya terjadi pertumbuhan tumor (Pudjiastuti, 1997).



Gambar : Ikatan kovalen senyawa dihidriol-epoksida B(a)P dengan DNA (Khotib 1998)

## 2.9 Tanaman Teh

Tanaman teh berasal dari tanaman perdu *Camelia Sinensis* Varietas *Asramica*, tanaman pada ketinggian 800 s/d 1200 meter dari permukaan laut. Rata-rata tanaman perdu teh berproduksi terus menerus 25 tahun sampai 40 tahun, namun kadang bisa lebih dari ini tergantung keadaan tanah perkebunan. Bagian tanaman teh yang digunakan untuk proses produksi berasal dari daun teh yang dipetik pada daerah pucuk daun berujung pendek, berair dan berdaun muda. Pada pucuk daun teh terkandung berbagai macam substansi baik yang dapat larut dalam air maupun tidak. Komponen kimia yang terkandung dalam daun kering teh, sebagai berikut :

Kandungan	Persentase dalam daun kering
Polyphenols, Catechins, and its oxidated deritive	10 - 25%
Flavonols	0.6 - 0,7%
Caffeine	2 - 4%
Complex sugars (Glycosides)	Approx. 0,6%
Vitamin C	150-250 mg%
Vitamin E	25-70 mg%
Carotene	13-29 mg%
Saponia	Approx 0,1%
Fluoride	90-350 PPM
Zinc	30-75 PPM
Selenium	1.0-1,8 PPM
Magnesia	400-2000 PPM

Polifenol adalah senyawa yang terpenting dan khas pada daun teh. Polifenol, seperti halnya alkohol, mempunyai kelompok dan sifat yang luas. Polifenol yang terdapat dalam teh adalah derivat asam galik dan katekin. Ada empat senyawa utama dengan konfigurasi kimiawi pada katekin dan asam galik, ialah : Kathekin, Galokathekin, Epitekin, Epigallo Katekin. Pigmen bagian daun yang mengandung : Khlorofil, pigmen merah dan kuning yang berasal dari antosianin dan enzim flavona. Vitamin adalah riboflavin (Vitamin B2) yang terdapat di dalam daun teh dan tetap berada selama pembuatan dan penyimpanannya. Asam askorbik (vitamin C) terdapat juga di dalam daun teh tetapi teroksidasi ketika proses peragian pada pembuatan teh hitam.

### **2.9.1 Teh Hitam**

Teh hitam dihasilkan karena proses peragian (fermentasi). Proses produksi teh hitam ini dilakukan secara bertahap, terdiri dari :

1. Penerimaan daun pucuk. Bagian tanaman teh yang dipetik adalah ujung pendek yang berair dan berdaun muda. Daun teh dipetik secara borongan oleh pemetik teh yang mahir, tiap seminggu sekali. Bahan teh diambil dari bagian pucuk (mulai pucuk daun sampai dua daun di bawahnya). Daun yang

terkumpul dibawa ke bagian penerimaan untuk diproses lebih lanjut.

2. Pelayuan daun, daun teh dilayukan untuk menghasilkan 1/3 berat daun lewat penguapan, mengurangi kandungan air 50-60%. Daun teh diletakkan pada tempat datar jejaring kawat dengan udara hangat, dengan ketebalan lapisan tertentu. Jendela ruangan kadang dibuka, atau ditambah dengan kitiran udara.
3. Penggilingan, setelah dilayukan daun digiling, penggilingan menggulung dan meremas daun teh untuk mengeluarkan airnya (katekin dan enzim), sehingga bercampur. Dengan meremas terjadi pencampuran polifenol dan enzim oksidasi, yang semula berada terpisah dalam daun teh. Di dalam mesin prosesnya adalah mengempa dedaunan dan membalikinya. Penggilingan daun teh layu dilakukan dengan mesin, digulung dan diremas. Bila penggilingan selesai dilakukan pengayakan. Proses ini dimaksud untuk mempersiapkan proses peragian yaitu mendinginkan dan mengangin-anginkan daun, serta memisahkan daun supaya mengelompok dalam ukuran yang sama sehingga peragian waktunya sama. Bila masih ada daun teh ukuran besar setelah pengayakan mungkin dilakukan penggilingan kedua.
4. Fermentasi (Peragian). Selesai digiling kemudian disebar dalam nampan dalam ruangan yang bersuhu + 27°C (sejuk) dan kelembaban tertentu, untuk diragikan. Teh hitam

umumnya berasal dari daun teh yang dioksidasi yang terjadi wajar ini mengubah warna daun teh yang semula hijau muda menjadi berwarna merah tua (coklat tembaga), sering menjadi bentuk ramping. Saat melanjut, daun warnanya berubah menjadi gelap, rasa dan abu khas daun teh berkembang. Fermentasi mengubah struktur kimia daun teh, merupakan kunci sifat rasa teh, tetapi tidak menyebabkan teh bersifat lir alkohol. Bila fermentasinya berlebihan yang tinggal adalah rasa manis, sedangkan mutu dan aromanya menurun atau hilang. Oksidasi polifenol yang terjadi dalam teh hitam bertanggung jawab terhadap warna cairan teh menjadi minuman merah tua, dengan rasa manis sedikit asam. Makin lama proses fermentasi, makin banyak kandungan kafein pada hasil akhirnya. Setelah 1-5 jam, dengan pengawasan yang ketat untuk memperoleh warna yang tepat dan bau teh yang menyengat, kemudian dilakukan pengeringan.

5. Pengeringan daun teh kemudian dikeringkan pada suhu antara 80 - 95 derajat celcius. Dengan udara luar antara 50-55 derajat celcius. Suhu 120°C di dalam alat pengering dengan menyemprot udara panas untuk mengambil seluruh kelembaban (*moisture*) dan menghentikan proses fermentasi. Lama pengeringannya antara 15-25 menit. Pada proses ini dianggap semua bakteri akan mati, dan tidak akan mempengaruhi hasil produksi akhir. Pengeringan pada suhu

tertentu ini dimaksud untuk mempertahankan rasa khas tehnya. Pengeringan yang baik lebih besar 2%-3% kelembaban, atau lebih kecil 12% kelembaban, aroma bertahan dan tidak mudah berjamur.

### 2.9.2 Bioaktivitas teh hitam

Penggolongan obat antikanker dapat dikelompokkan menjadi 4 bagian terbesar antara lain, golongan alkilator, antimetabolit, produk alamiah dan hormon atau antihormon. Bioaktivitas antikanker teh hitam karena kandungan bahan kimianya yang potensi menghambat metabolisme berbagai senyawa karsinogenik dapat dikategorikan sebagai anti metabolit (Chen, 1997). Laporan Yoshino (1994) pada proses fermentasi (Oksidasi) teh hitam akan dihasilkan theaflavin (TF) dan thearubigin (TR), merupakan substansi sama dengan katekin yang terdapat di dalam daun teh hijau. Katekin ini mempunyai struktur kimiawi hydroxiphenol (Polyphenol). Kandungan poly-phenol baik pada katekin maupun pada Theaflavin (TF) mempunyai aktivitas yang sama yaitu sebagai anti oksidan. Hasil penelitian lainnya oleh Katiyar (1997) bahwa Theaflavin teh hitam mampu menghambat *phorbol-12-13-acetate* ester tumor promotor 12-O - *tetradecanoyl phorbol-13-acetate* sehingga menurunkan proses karsinogenesis. Antikanker pada kulit mice akibat terpapar sinar UVB, (Huang-MT, 1997).



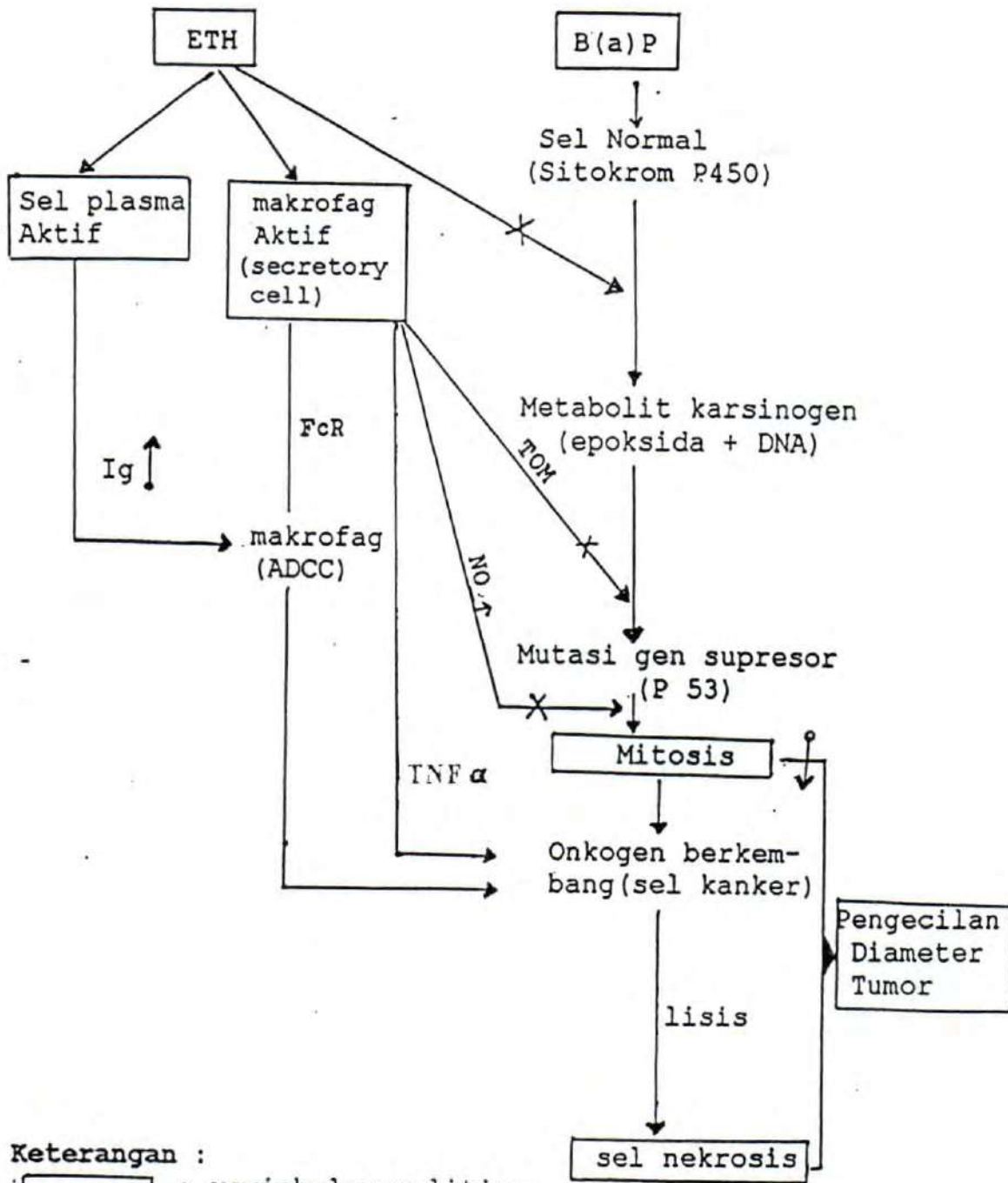
senyawa polyphenol pada teh baik teh hijau maupun teh hitam mampu menghambat aktivitas, katalitik enzim-enzim P 450 (*mixed function oxidation*). Hal ini didukung oleh penelitian Chen dan Yen (1997) bahwa berbagai jenis ekstrak teh baik hitam maupun hijau bersifat antimutagenik dengan cara menghambat aktifitas metabolisme sitokrom P450 dan mengadakan interaksi dengan pro mutagen maupun metabolit B(a)P. Teh hitam juga dapat bertindak sebagai antioksidan terhadap radikal bebas yang berlebihan di dalam tubuh. Benzopirena yang dikenal sebagai senyawa prokarsinogenik, agar potensial maka dime-tabolisme menjadi senyawa hidroksil epoksida. Senyawa ini bila bereaksi dengan oksigen akan terbentuk senyawa karbonium yang reaktif dapat berikatan dengan makromolekul termasuk DNA. Dengan pemberian teh hitam dapat meredam radikal reaktif tersebut sehingga kerusakan DNA dapat dihindari. Selain itu komponen lainnya seperti flavonoil dapat meningkatkan baik imunitas maupun anti oksidan, begitu pula vitamin C, E, karoten diyakini sebagai antioksidan, sama halnya dengan komponen flouride, Zine, selenium, magnesia dapat meningkatkan imunitas (Webrnaster, 1996).

# BAB 3

BAB 3

3.1

Bagan Kerangka Konseptual



Keterangan :

- : variabel penelitian
- ↑ : peningkatan
- ↓ : penurunan
- X : penghambatan
- ETH : Ekstrak Teh Hitam
- B(a)P : Benzopirene

### 3.2 Keterangan kerangka konseptual

Benzopirene atau B(a)P agar menjadi senyawa ultimate carcinogen dimetabolisme oleh enzim Mixed Function Oxidative (MFO) di sitokrom P450. Senyawa ini sangat reaktif dan dapat berikatan secara kovalen dengan DNA, akibatnya DNA rusak. Apabila kerusakan tidak parah maka dapat diperbaiki, oleh gen repair, namun bila sangat berat akibatnya terbentuk mutant. Akumulasi dari mutasi dapat menyebabkan terjadinya kanker. Bila individu yang terpapar B(a)P diberikan ekstrak teh hitam (ETH) maka aktivitas metabolisme MFO dapat dihambat atau dicegah, sehingga tidak terjadi kerusakan DNA, atau kerusakan tidak parah sehingga masih dapat diperbaiki. Adanya berbagai gangguan tersebut kemungkinan menyebabkan bangkitnya respon imun sebagai upaya memperbaiki homeostasis, selain itu ETH sebagai zat asing dalam tubuh mampu membangkitkan respon imun. Bangkitnya respon imun akan meningkatkan aktivitas sel imunokompeten. Adanya kemungkinan beberapa DNA rusak lepas dari kontrol gen repair, maka akan terbentuknya mutant dan sel kanker. Sel kanker yang pada permukaannya menjadi protein antigen (TSAs) menyebabkan bangkitnya respon imun. Peningkatan aktivitas sel imunokompeten oleh karena pemberian ETH, maka sistem perondaan terhadap sel kanker juga meningkat. Aktivitas sistem

imunitas terhadap kanker diperankan oleh makrofag yang aktif atau makrofag sekretori dengan mengeluarkan berbagai sitokin agar dapat melisis sel kanker, selain itu dikeluarkan *nitric oxyde (NO)* sebagai anti replikasi, *oxygen metabolite (TOM)* sebagai antioksidan. Immunoglobulin yang dikeluarkan sel plasma ikut berperan dengan cara mengadakan ikatan dengan Fc reseptor makrofag atau NK Sel.

### 3.3 Hipotesis

1. Ekstak teh hitam memperbaiki sistem ketahanan imunologik seluler mukosa mulut mencit yang terpapar B(a)P
2. Ekstrak teh hitam menghambat progresivitas tumor rongga mulut mencit yang terpapar B(a)P.

# BAB 4

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksplanatif dengan menggunakan metode eksperimental dan pendekatan imunopatobiologi. Rancangan penelitian *experiment post test only group design* dengan hewan coba mencit (*mus musculus*) jantan strain Balb C.

#### 4.2 Populasi penelitian

Populasi penelitian adalah mencit yang berasal dari PUSVETMA dengan sampel terdiri atas 32 ekor mencit dalam kondisi sehat, jenis kelamin jantan, berusia 1-2 bulan dengan berat badan seragam 20-25 gram diambil secara simple random sampling dibagi menjadi 4 kelompok, setiap mencit dimasukkan dalam 1 kandang dan diberi nomor sebagai tanda.

#### 4.3 Besar sampel

Rumus untuk mencari sampel menurut Higgins (1985) adalah :

$$N = \frac{1}{(1 - f)} \times \frac{2 (Z\alpha + Z\beta)^2 S_c^2}{(X_c - X_t)^2}$$

Keterangan :  $\alpha = 5\%$        $\beta = 10\%$

F = proporsi yang gagal

Xc = Nilai rata-rata kelompok kontrol

Xt = Nilai rata-rata kelompok perlakuan

Sc = Standar deviasi kelompok kontrol

Perhitungan jumlah sampel :

$$Z \alpha = 1,98 \qquad Xc = 116,42$$

$$Z \beta = 1,28 \qquad Xt = 106,62$$

$$f = 0,5 \qquad Sc = 8,31126$$

$$\begin{aligned} \text{Rumus : } n &= \frac{1}{1-f} \times \frac{2 (Z\alpha + Z\beta)^2 Sc^2}{(Xc - Xt)^2} \\ n &= \frac{1}{(1-0,5)} \times \frac{2 (1,98 + 1,28)^2 (8,31126)^2}{(116,42 - 106,62)^2} \\ n &= \frac{1}{(1-0,5)} \times \frac{2 (3,26)^2 (69.022)}{(9,80)^2} \\ n &= \frac{1}{0,5} \times \frac{2 (10,6276) \cdot (69.022)}{96} \\ n &= \frac{1}{0,5} \times \frac{(21.2552) \cdot (69.022)}{96} \\ n &= \frac{1468,245}{192} = 7,74085 = 8 \end{aligned}$$



Besar sampel (n) pengulangan yang harus dilakukan pada penelitian ini adalah 8 kali. Mengingat penelitian ini mempunyai 4 kelompok maka sampel yang dibutuhkan pada penelitian ini sebanyak 32 ekor mencit.

#### 4.4 Definisi Operasional Variabel

Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah :

1. Jumlah sel makrofag yang aktif dari jaringan mukosa rongga mulut. Makrofag aktif dengan teknik pemulasan histokimia Aldehyde Fuschin secara mikroskopik menunjukkan gambaran sel makrofag dengan vesicle pinositik besar, dan granul lisosom sitoplasmik berwarna kuning kecoklatan, dilihat dengan pembesaran 400x. Penghitungan jumlah kuantitatif sel makrofag dengan sistem grateculae.
2. Jumlah sel plasma aktif dari jaringan mukosa rongga mulut, adalah sel plasma aktif dengan teknik pulasan histokimia D-PAS secara mikroskopis menunjukkan gambaran Imunoglobulin dalam sitoplasma sel berwarna merah magenta, dilihat dengan pembesaran 400x. Penghitungan jumlah kuantitatif sel plasma dengan sistem grateculae.
3. Nekrosis sel kanker atau tumor, dengan pemulasan HE secara mikroskopis inti menunjukkan gambaran piknosis, karyoreksis, karyolisis dan sitoplasma lebih eosinofilik.

- dilihat dengan pembesaran 400x. Penghitungan nekrosis sel kanker dengan sistem persentase.
4. Mitosis sel kanker atau tumor, dengan pemulasan HE secara mikroskopis menunjukkan gambaran sel dengan inti hiperkromatik, membesar bagian tepi tidak teratur, dilihat dengan pem-besaran 400x. Penghitungan jumlah sel mitosis dengan sistem grateculae.
  5. Diameter tumor, diukur garis tengah terbesar tumor secara makroskopik dengan menggunakan jangka sorong.
  6. Benzopirene 20 mg dilarutkan dalam 10 ml oleum olivarium dari pabrik SIGMA atau 8 mg/kg BB setara dengan 0,05 ml larutan.
  7. Ekstrak teh hitam berbentuk serbuk kristal non higroskopik dosis 100 mg/kg & 80 mg/kg BB.

#### **4.5 Klasifikasi dan Definisi Variabel Penelitian**

Pada penelitian ini diidentifikasi ada empat macam variabel penelitian yaitu variabel bebas, variabel tergantung, variabel penghubung dan variabel kendali.

##### **4.5.1 Variabel bebas**

Benzopirene dosis 8 mg/kg BB produksi SIGMA, ekstrak teh hitam dosis 100 mg/kg BB dan 80 mg/kg BB.

#### 4.5.2 Variabel tergantung

Jumlah sel makrofag aktif, dengan pemeriksaan histokimia *Aldehyde Fiechsin Methode* (AFM), sel plasma aktif dengan pemeriksaan histokimia D-PAS, sel-sel kanker atau tumor yang secara mikroskopik menunjukkan adanya mitosis, nekrosis dan diameter tumor secara makroskopik.

#### 4.5.3 Variabel penghubung

Cara kerja ekstrak teh hitam dalam meningkatkan respons imun mukosa mencit (*mus musculus*) strain Balb C yang telah mengalami immunosupresif akibat terinduksi benzopirin. Mekanisme inaktivasi karisinogenesis akibat peningkatan sistem ketahanan imunologik setelah pemberian ekstrak teh hitam.

#### 4.5.4 Variabel kendali

1. Jenis mencit *mus musculus* strain Balb C jantan, umur mencit 1-2 bulan, berat badan mencit 20-25 gram, makanan jenis 521 dan minuman aqua ad libitum, perawatan dan sanitasi kandang.
2. Cara pemberian perlakuan , larutan benzopirene 0,05 ml dimasukkan dengan jarum sonde ke dalam rongga mulut lokasi mukosa bukal. Setelah 1 jam diberi ekstrak teh hitam cair sebanyak 0,5 ml dimasukkan dengan sonde ukuran 1 ml ditunggu beberapa saat sampai seluruh cairan tertelan.

#### 4.6 Bahan Penelitian.

Bahan penelitian terdiri dari beberapa macam, antara lain :

##### 4.6.1 Ekstrak teh hitam

Teh hitam jenis BOP diperoleh dari PT SANTOON PTP XII Wonosari Malang Jawa Timur. Pembuatan ekstrak teh hitam, pertama kali dilakukan *decaffainated* (penghilangan zat kafein) dengan cara maserasi atau perendaman daun teh hitam ke dalam CHCL<sub>3</sub> secara bertahap yaitu :

1. 500 gram daun teh direndam dalam 1300 ml CHCL<sub>3</sub> selama 24 jam diulangi lagi perendaman dengan mengganti CHCL<sub>3</sub> 1100 ml selama 7 x 24 jam penggantian sampai akhirnya didapatkan ekstrak teh hitam bebas kafein.
2. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) atau Thin Layer Chromatography. Tujuannya untuk identifikasi kandungan kafein dalam teh. Caranya 0,5 gram ekstrak teh ditambah 5 cc CHCL<sub>3</sub> dimasukkan dalam solvent etil asetat 10 ml, metanol 1,35 ml, air 1 ml. Pada plat Kieselgel 60 F 254 (KLT aluminium silica gel) dibandingkan ekstrak teh hitam dalam solvent dengan standar kafein. Apabila ekstrak teh hitam bebas kafein maka gambaran warna pada KLT berbeda (lebih menipis) dibandingkan standard.

3. Hasil ekstrak *decafein* dilakukan ekstrak air dengan cara 50 gram bahan ekstrak dimasukkan dalam air sebanyak 1000 ml direbus sampai mendidih, dibiarkan selama 15 menit.
4. Hasil ekstrak air dikristalkan dengan cara *Freeze drying* sehingga menjadi serbuk kristal dan dianalisis sesuai standard SIGMA.

#### 4.6.2 Benzopirene

Benzopirene dari pabrik SIGMA sebanyak 20 mg dilarutkan kedalam 10 ml oliveum olivarium

#### 4.6.3 Jenis hewan coba

Mencit strain Balb C jantan, usia 1-2 bulan berat badan 20-25 gram sebagai binatang percobaan

#### 4.6.4 Bahan pemulasan

Bahan kimia untuk pemulasan histokimia Aldehyde Fuschin Methode; Diastase PAS; HE (lihat lampiran)

### 4.7 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dikelompokkan menjadi 2 yaitu :

#### 4.7.1 Peralatan untuk perlakuan.

kandang mencit, botol minuman 300 ml, timbangan mencit, jarum sonde tumpul ukuran 1 ml, gelas ukur, pinset, scalpel, gunting, tabung Nalgene (untuk penyimpanan jaringan segar) dan autoclave.

#### 4.7.2 Peralatan untuk analisis.

Alat untuk pembuatan ekstrak teh hitam terdapat di laboratorium Fakultas Farmasi Unair, Lab. Dasar Bersama Unair, PAU Jogjakarta, alat untuk pemrosesan jaringan dan pemulasan preparat serta untuk analisis sel imunokompeten dan sel kanker di lab. Gramik dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Unair, obyek glass, cover glass, mikroskop, grate culae, spektrofotometri.

#### 4.8 Kelompok Perlakuan

- Kelompok I : Kelompok kontrol negatif, 8 ekor mencit diberi aqua saja dengan menggunakan sonde sebanyak 0,5 ml, setiap hari selama 30 hari (dalam visualisasi gambar disebut placebo)
- Kelompok II : Kelompok kontrol positif sebanyak 8 ekor dan setiap mencit dipapar benzopirene dengan cara peroral menggunakan jarum sonde insulin dosis 8 mg/kg BB setara dengan larutan 0,05 ml oleum olivarium setiap 2 kali seminggu setiap senin dan kamis selama 4 minggu diaklimatisasi sampai dengan 12 minggu (dalam visualisasi gambar disebut BP).

Kelompok III : Kelompok perlakuan sebanyak 8 ekor dan setiap mencit diberi benzopirene dengan cara per oral menggunakan jarum sonde insulin dosis 8mg/kg BB setara dengan larutan 0,05 ml oleum olivarium setiap 2 kali seminggu selama 4 minggu. Setelah 1 jam diberi ekstrak teh hitam dosis 100 mg/kg BB per oral menggunakan jarum sonde, setiap hari selama 4 minggu. Kemudian diaklimatisasi sampai dengan 12 minggu (dalam visualisasi gambar disebut BP + t<sub>1</sub>).

Kelompok IV : Kelompok perlakuan, 8 ekor mencit diberi benzopirene dan ekstrak teh hitam seperti pada kelompok III, namun dosis ekstrak teh hitam 80 mg/kg BB (dalam visualisasi gambar disebut BP + t<sub>2</sub>).

#### 4.9. Unit Analisis

Hasil biopsi operasi jaringan mukosa rongga mulut & tumor di rongga mulut mencit. Jaringan segar hasil pengirisan disimpan di dalam nitrogen cair, dengan suhu -190° C.

#### **4.10 Waktu dan Tempat penelitian**

##### **4.10.1 Tempat penelitian**

1. Penelitian perlakuan terhadap hewan coba di laboratorium Biokimia FK Unair dan Lab.kandang Fakultas Farmasi Unair.
2. Pemrosesan jaringan dilakukan di laboratorium GRAMIK dan Laboratorium Patologi Anatomi FK Unair.
3. Pembuatan ekstrak teh hitam dilakukan di laboratorium Fitokimia FF Unair, LDB Unair dan PAU UGM Jogjakarta.

##### **4.10.2 Waktu penelitian**

Waktu penelitian dimulai sejak proposal ini diterima, bulan Desember 1998 sampai Juli 1999, dilanjutkan 2 bulan untuk pengumpulan data 2 bulan kemudian untuk analisa data dan 2 bulan pembuatan laporan.

#### **4.11 Prosedur Kerja**

Prosedur kerja dibedakan menjadi dua tahap yaitu : Tahap pertama pelaksanaan eksperimen, tahap kedua pembuatan preparat sediaan.

##### **4.11.1 Pelaksanaan eksperimen**

Tahap ini dibagi beberapa tahap, yaitu :



1. Mempersiapkan sampel penelitian
  - a. Mempersiapkan mencit sesuai ciri populasi penelitian, sejumlah 40 ekor mencit dari PUSVETMA Surabaya.
  - b. 40 ekor mencit diadaptasi selama 1 minggu dalam satu kotak ukuran 1 meter x 0,5 meter x 0,6 meter, alas kandang diberi sekam setebal 10 cm setiap 3 hari diganti. Minuman diberikan dalam botol 300 ml yang dilengkapi selang plastik sebanyak 3 botol diisi air masak. Makanan diberikan dengan cara ditabur merata pada dasar kandang.
  - c. Setelah karantina selama 1 minggu dan kondisi mencit sehat maka diambil 32 ekor secara random. Setiap ekor tikus diletakkan pada 1 ruangan kandang. Secara random pula ditentukan macam perlakuan yang diterapkan pada tiap ekor mencit. Setelah ditentukan secara random tiap kandang dan mencit diberi tanda.
2. Mempersiapkan dosis ekstrak teh hitam dan benzopirene
  - a. Pembuatan larutan ekstrak teh hitam
    1. dosis 80 mg/kg Bb, dengan cara mengambil 2 mg ekstrak teh hitam dilarutkan dalam 0,05

- ml aquades untuk mencit dengan berat badan  $\pm$  25 gr.
2. Dosis 100 mg/kg BB, dengan cara mengambil 2,5 mg ekstrak teh hitam dilarutkan dalam 0,5 ml aquades untuk mencit dengan berat badan 25 gr.
- b. Pembuatan larutan benzopirene dengan cara mengambil benzopirene 20 mg dilarutkan dalam olivarium 10 ml, setiap mencit dipapar 0,05 ml.

#### 4.11.2. Prosedur pelaksanaan penelitian

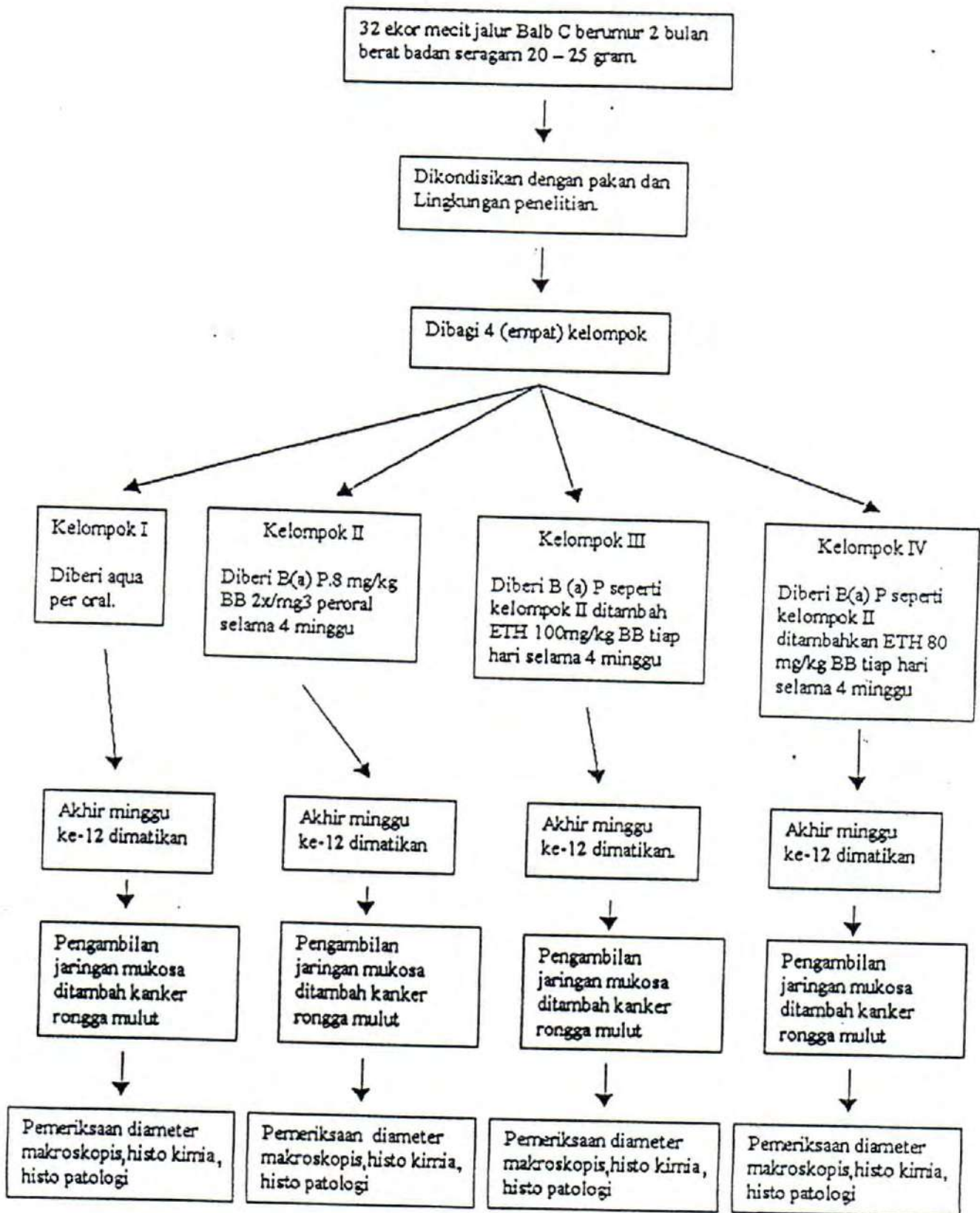
1. Mencit jantan strain Balb C diadaptasikan dengan kondisi lingkungan penelitian selama satu minggu, kemudian dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing 8 ekor
2. Setiap mencit ditimbang dan dimasukkan ke dalam kandang individual berukuran 20x15x15 cm. Berat badan hasil penimbangan digunakan sebagai dasar pembuatan larutan Benzopirene dan ekstrak teh hitam.
3. Perlakuan terhadap mencit berupa pemberian benzopirin dimulai pada saat mencit berusia 2 bulan sesuai dengan dosis yang telah ditentukan

4. Pemberian larutan Benzopirene 2 kali seminggu setiap hari senin dan kamis selama 4 minggu dengan paparan di dalam mukosa rongga mulut. Pemberian ekstrak teh hitam dimulai 1 jam setelah diberi benzopirene dan setiap hari selama 30 hari secara peroral. Setiap hari kondisi mencit dipantau.
5. Pada akhir minggu ke 12 mencit dimatikan dan diambil jaringan mukosa rongga mulut dan jaringan yang mengalami perubahan berupa benjolan tumor untuk dipersiapkan sebagai sediaan D-PAS dan AFM dan HE. Jaringan segar disimpan didalam nitrogen cair suhu - 190°C.
6. Pewarnaan pada sediaan dilakukan dengan prioritas
  - a. sel plasma dengan D-PAS
  - b. makrofag dengan pemeriksaan AFM
  - c. Sel kanker dengan HE

#### 4.12 Analisis Data

Data penelitian dianalisis dengan multivariat analisis of varians (Manova) untuk melihat perbedaan respon imun (jumlah sel makrofag dan sel plasma) antar kelompok perlakuan, perbedaan progresivitas kanker (jumlah sel nekrosis, mitosis dan diameter tumor). Analisis juga dilakukan untuk melihat kecenderungan hubungan antara progresivitas kanker atau tumor dengan respon imun, untuk analisis

yang kedua ini digunakan trend linier dan trend eksponensial dengan terlebih dahulu melakukan standarisasi data untuk menyamakan pengukuran. Semua analisis dikerjakan dengan paket program SPSS.



# BAB 5

## BAB 5

## HASIL DAN ANALISIS DATA PENELITIAN

## 5.1 Respons Imun

Pada hasil penelitian ini pengaruh pemberian ekstrak teh hitam (ETH) terhadap peningkatan respons imunologik seluler mukosa rongga mulut mencit yang terpapar benzo-pirene, diperoleh dari penghitungan jumlah kuantitatif dalam hal ini sel imunokompeten makrofag aktif dan sel plasma aktif. Pada tabel di bawah ini dapat rerata peningkatan sel imunokompeten.

Tabel 5.1 : Diskripsi variabel respons imun pada mencit strain Balb C yang terpapar B(a)P dan diberikan ekstrak teh hitam

Kelompok Perlakuan		Respon Imun	MAKROFAG		SEL PLASMA	
			Mean	SD	Mean	SD
1	Kontrol	0,000	0,000	0,9700	0,6093	
2	B(a)P	1,0712	0,2350	0,8290	0,1301	
3	B(a)P + ETH 100 mg/kg BB	2,2273	0,0909	1,5103	0,0691	
4	B(a)P + ETH 80 mg/kg BB	2,0817	0,0305	1,4746	0,0797	

Keterangan : B(a)P : Benzopirene

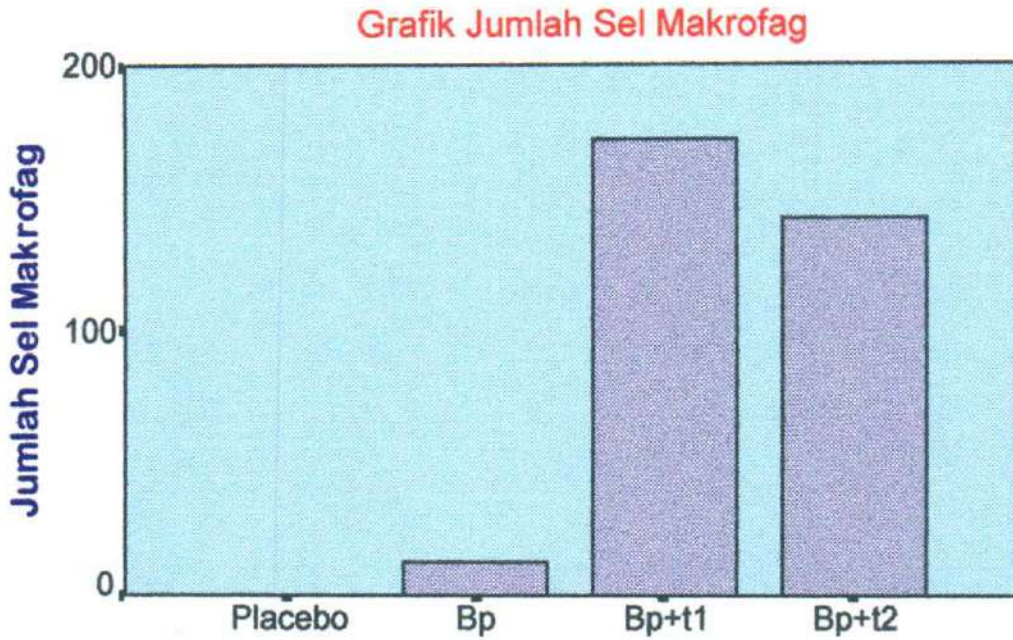
ETH : Ekstrak Teh Hitam

Tabel 5.1.2 : Multivariat . analisis varian respons imun  
antara kelompok kontrol dan perlakuan

Variabel	Test name	Value	Approx F	Hypoth DF	Error DF	Sig of F.
Respons imun	Willks	0,02076	53,45797	6,00	54,00	0,000

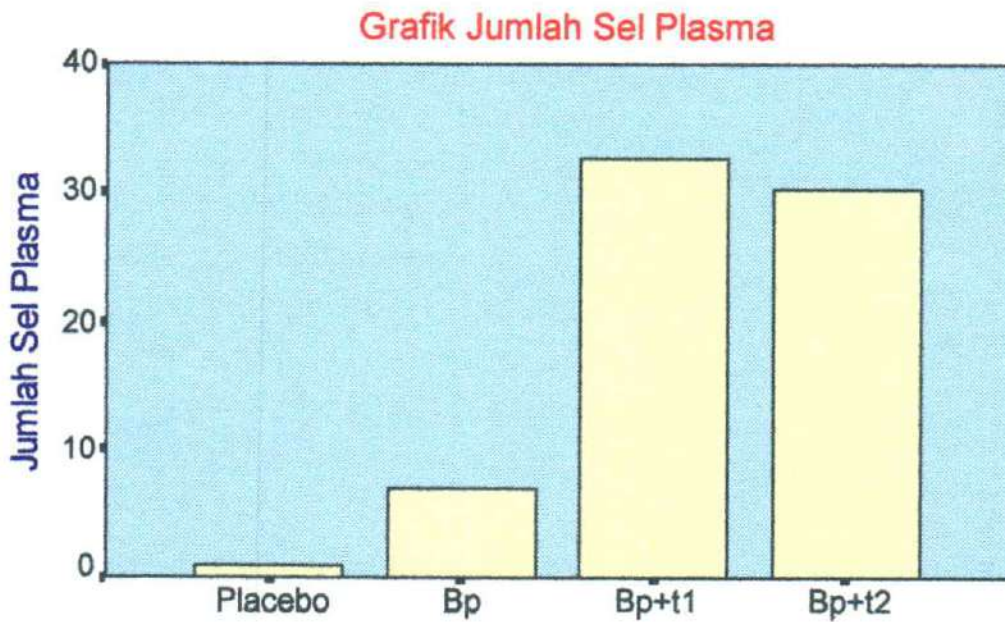
Dari hasil tabel 5.1 dan 5.1.2 menunjukkan ada perbaikan respons imun pada perlakuan pada mencit yang di papar B(a)P dan diberi ekstrak teh hitam baik dosis 100 mg/kg BB maupun 80 mg/kg BB. Pada dosis pemberian ekstrak teh hitam 100 mg/kg BB atau kelompok 4 ternyata terjadi peningkatan jumlah sel makrofag dan sel plasma lebih besar dibanding dosis 80 mg/kg BB. Ada perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dengan nilai Wilks<sub>0,02076</sub> dan Sig of F 0,000.





Gambar 5.1.1

Grafik pengaruh pemberian ekstrak teh hitam terhadap aktivasi sel makrofag rongga mulutmencit yang terpapar B(a)P



Gambar 5.1.2

Grafik pengaruh pemberian ekstrak teh hitam terhadap aktivasi sel plasma rongga mulut mencit yang terpapar B(a)P

## 5.2 Progresivitas Tumor

Hasil pada penelitian ini pengaruh pemberian ekstrak teh hitam (ETH) terhadap progresivitas tumor rongga mulut mencit yang terpapar B(a)P tampaknya terjadi penghambatan atau penurunan. Variabel yang digunakan untuk menyatakan progresivitas tumor adalah nekrosis yaitu sel kanker yang mengalami lisis; mitosis adalah sel kanker yang potensial berproliferasi dan diameter tumor secara makroskopik. Pada tabel dibawah ini dapat dilihat rerata penurunan progresivitas tumor antar kelompok perlakuan.

Tabel 5.2 Diskripsi variabel progresivitas tumor pada mencit strain Balb C yang terpapar B(a)P dan diberikan ETH.

Kelompok Perlakuan	Nekrosis		Mitosis		Diameter	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Kontrol/Placebo	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
B(a)P	1,2748	0,2303	1,3991	0,2071	0,4840	0,0461
B(a)P + ETH 100 mg/kg BB	1,5560	0,1497	0,8798	0,1483	0,2322	0,1647
B(a)P + ETH 80 mg/kg BB	1,6905	1,1913	1,0275	0,5480	0,2975	0,0596

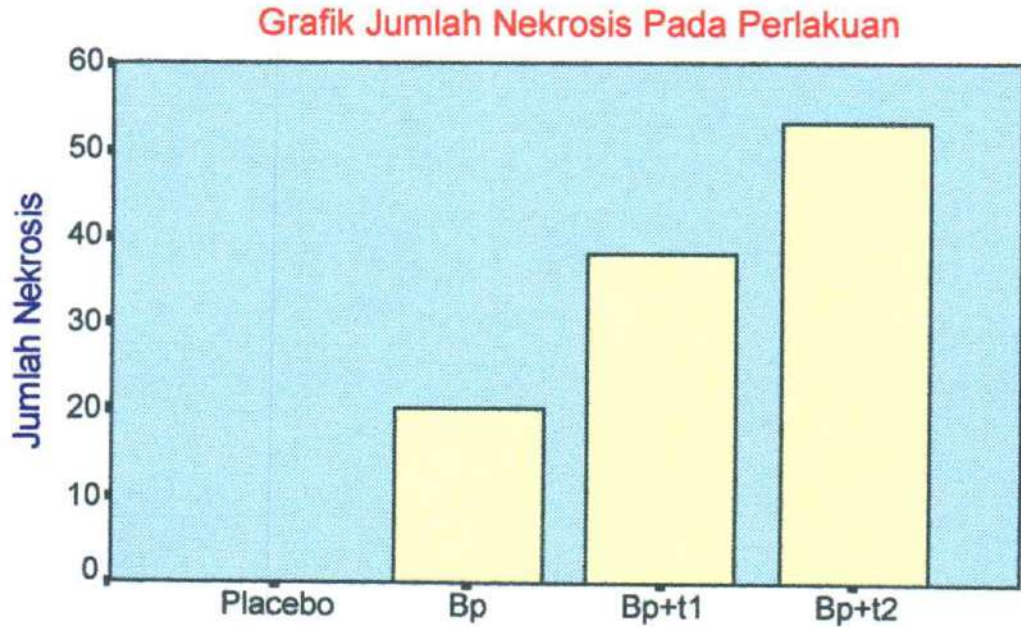
Keterangan : B(a)P : Benzopirene

ETH : Ektrak Teh Hitam

Tabel 5.2.1 : Multivariat analisis varian progresivitas tumor antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

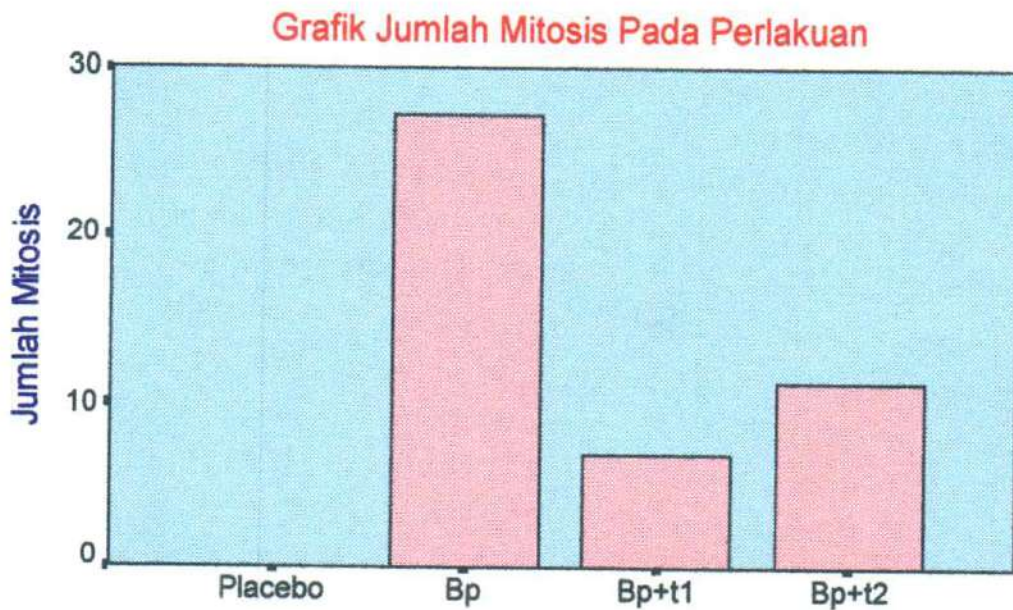
Variabel	Test name	Value	Approx F	Hypoth DF	Ferror DF	Sig F.
Progresivitas tumor	Wilks	0,00442	56,12960	9,00	60,99	0,000

Dari tabel 5.2 dan 5.2.1 dapat diperoleh hasil bahwa ada penurunan progresivitas tumor pada kelompok perlakuan yang ditambahkan ekstrak teh hitam baik dosis 100 mg/kg maupun pada dosis 80 mg/kg BB. Peningkatan nekrosis justru lebih besar pada pemberian ETH 80 mg/kg BB. Penurunan jumlah sel mitosis lebih banyak terjadi pada kelompok yang diberi ETH 100 mg/kg BB. Diameter tumor tampak terjadi pengecilan pada kelompok yang diberi tambahan ETH bila dibandingkan pada kelompok yang hanya diberi B(a)P. Dari data tersebut secara umum memberi gambaran adanya penurunan progressivitas tumor pada kelompok mencit yang diberi tambahan ETH baik dosis 100 mg/kg BB maupun 80 mg/kg BB. Ada perbedaan bermakna terhadap pro-gresivitas tumor antara kelompok kontrol dan perlakuan, dengan nilai Wilks 0,00442 dan Sig of F 0,000.



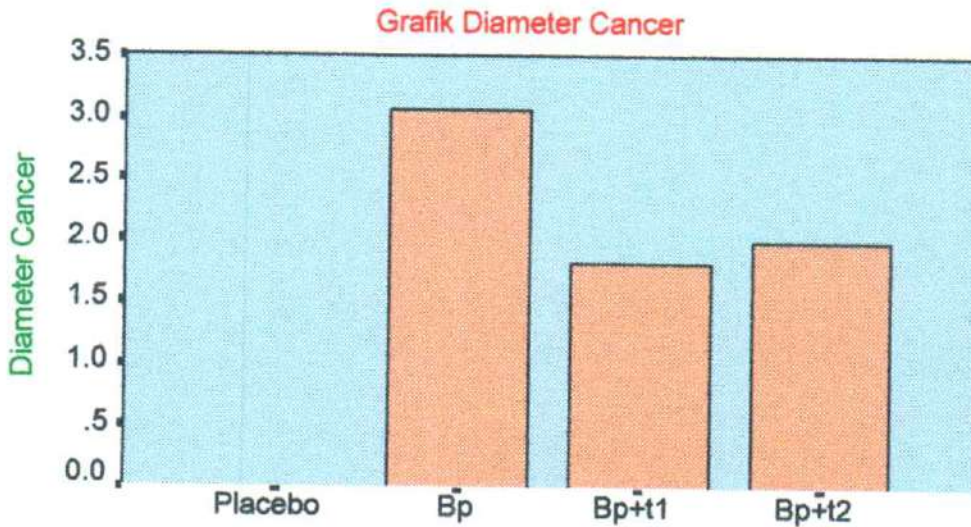
Gambar 5.2.1

Grafik pengaruh pemberian ekstrak teh hitam terhadap nekrosis sel kanker pada mencit yang terpapar B(a)P



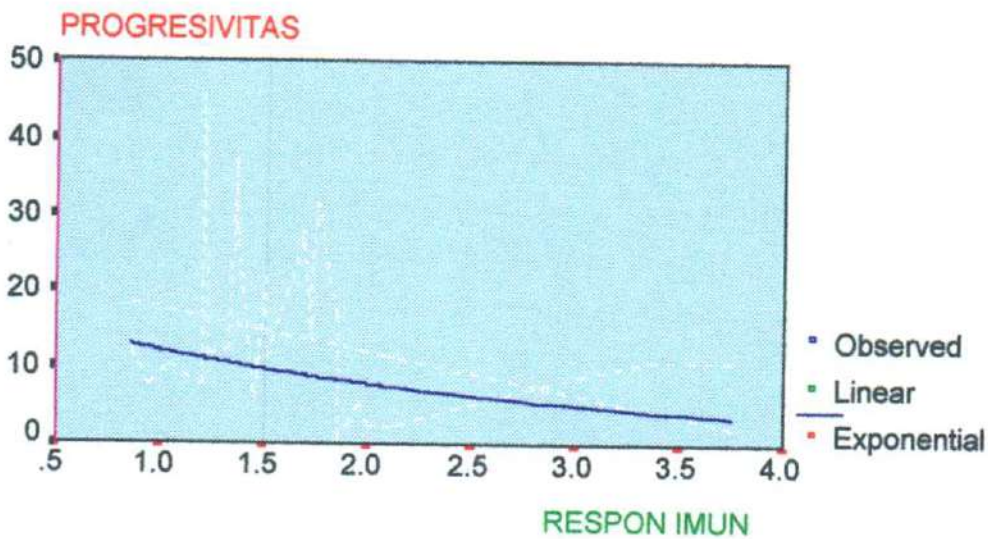
Gambar 5.2.2

Grafik pengaruh pemberian ekstrak teh hitam terhadap mitosis sel kanker pada mencit yang terpapar B(a)P



Gambar 5.2.3

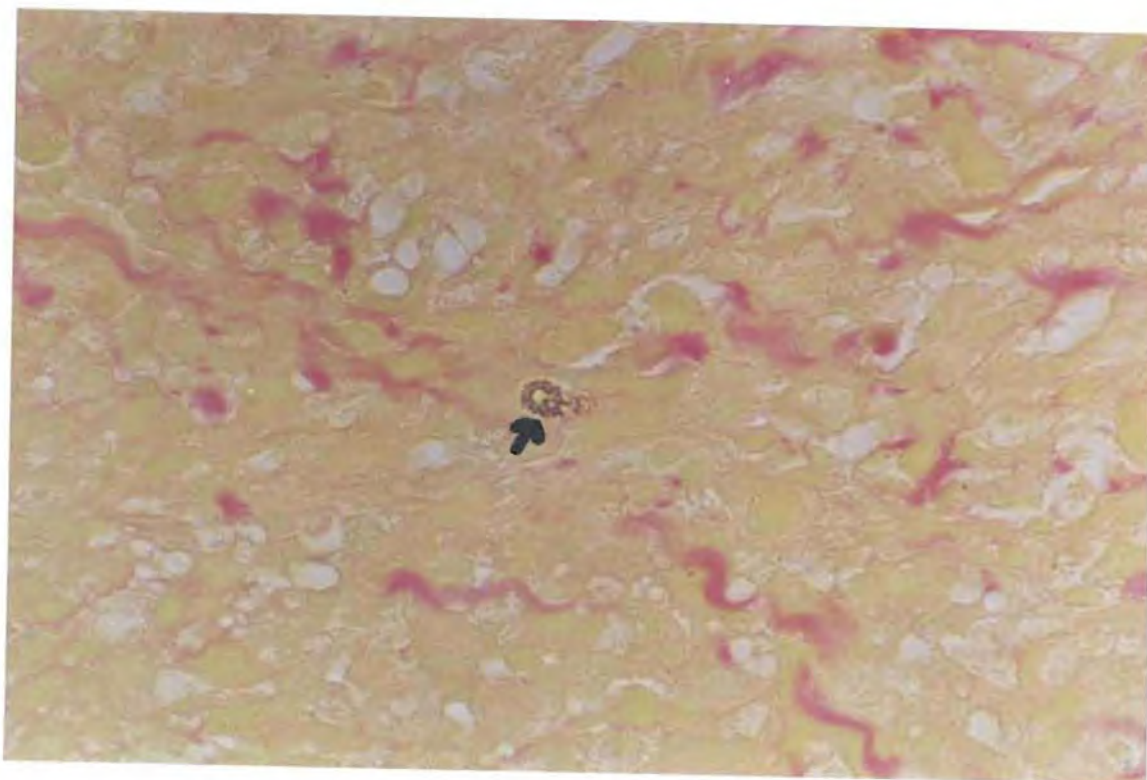
Grafik pengaruh pemberian ekstrak teh hitam terhadap diameter tumor pada mencit yang terpapar B(a)P



Gambar 5.3

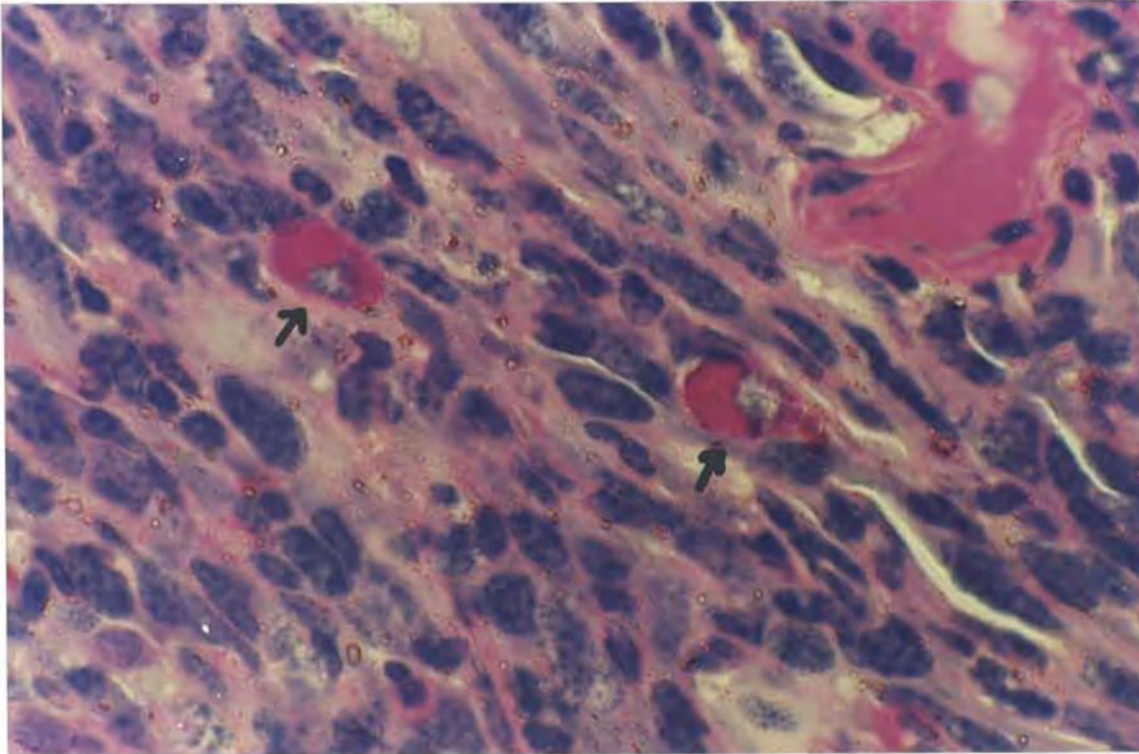
Hubungan Respon Imun dengan progresivitas kanker

Ada kecenderungan semakin baik respon imun, progresivitas kanker menurun

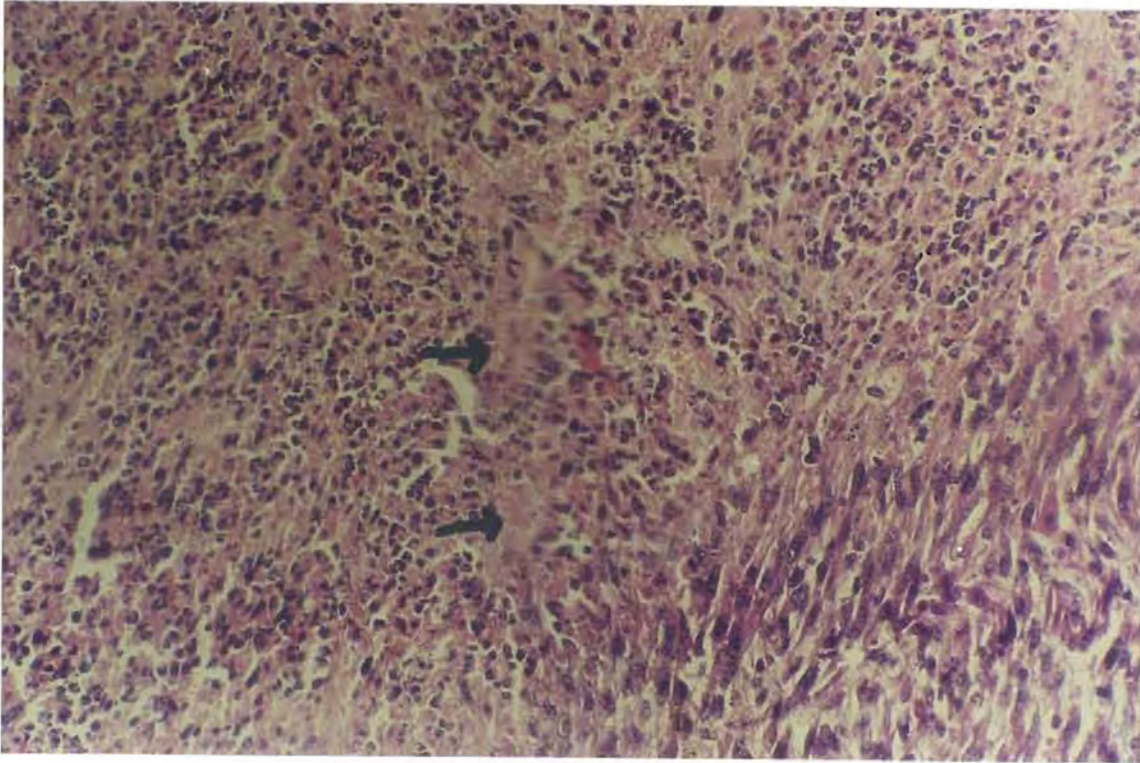


Sel makrofag aktif (panah) diantara sel tumor, tampak granul pinositik peningkatan sitoplasmik berwarna kecoklatan, pulasan Aldehyde Fuschin Methode dengan pembesaran 400 x.



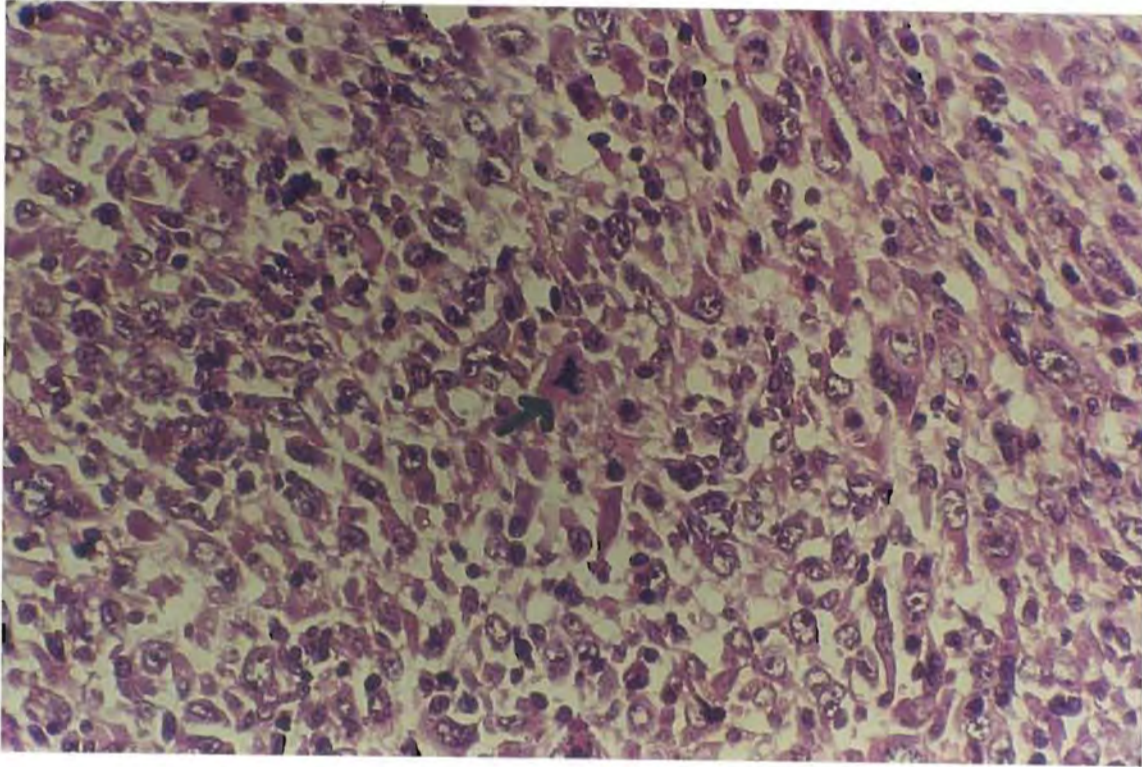


Sel plasma aktif (panah) diantara sel tumor , tampak sitoplasmik berwarna merah magenta, pulasan D-PAS, dengan pembesaran 400 x

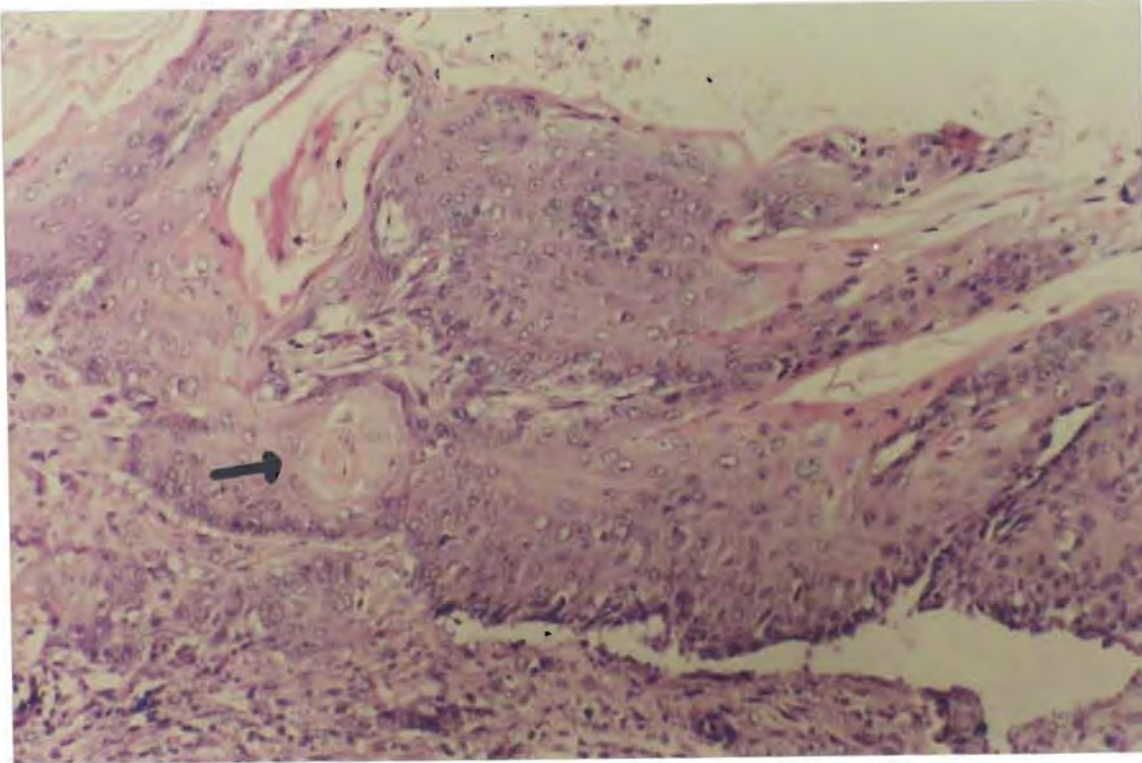


Sel kanker yang mengalami Nekrosis (panah) pada Fibro Sarkoma, pulasan HE, dengan pembesaran 400 x

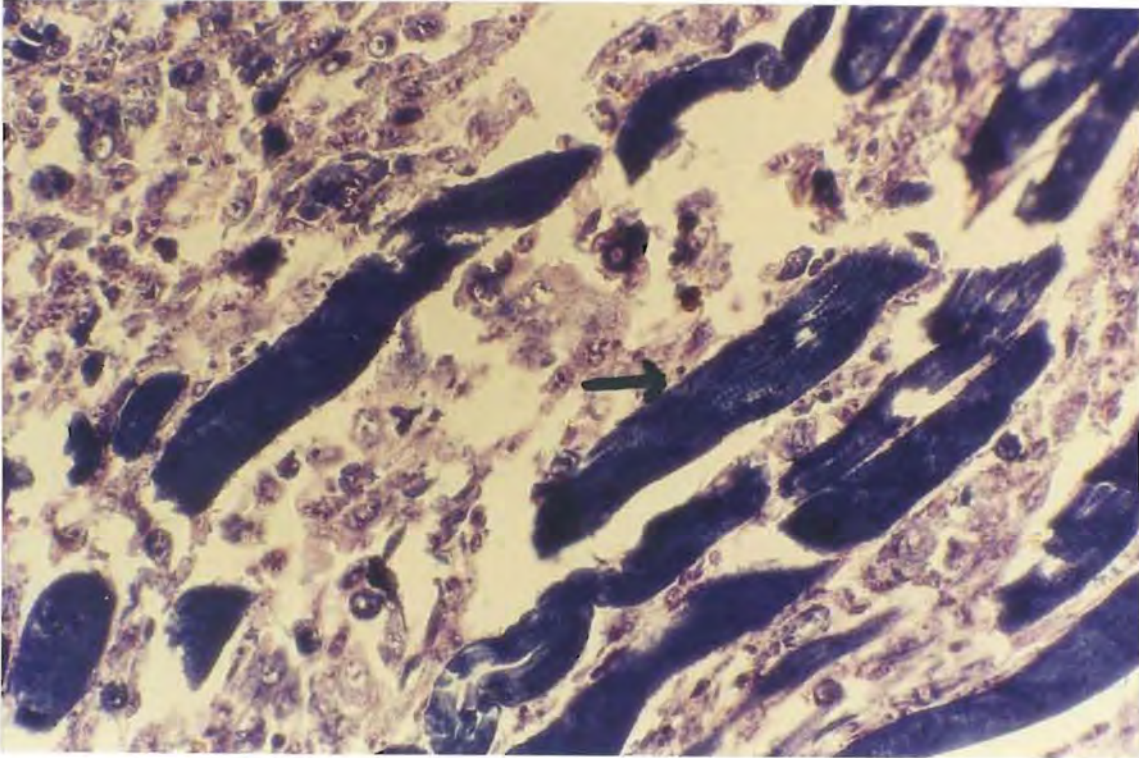




Sel kanker yang mengalami Mitosis (panah) pada Malignant Fibro Histiocytoma, pulasan HE, dengan pembesaran 400 x



Karsinoma sel skuamus, pada mukosa rongga mulut mencit, terpapar B(a)P dan pemberian ETH dosis 100 mg/kg BB, dosis 100 mg/kg BB, pulasan HE, dengan pembesaran 400 x



Sel kanker pada Rhabdomyo Sarkoma rongga mulut mencit yang terpapar B(a)P dan pemberian ETH dosis 80 mg/kg BB tampak adanya *striated muscle* (panah), pulasan PTAH, dengan pembesaran 400 x

# BAB 6

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Benzopirene atau B(a)P merupakan senyawa karsinogen poten menimbulkan kanker, seperti yang dilaporkan Cotran dkk (1999) senyawa ini paling sering ditemukan pada kanker. Hal ini terbukti dari penelitian ini, dengan paparan B(a)P sebesar 8 mg/kg berat badan atau 0,1 mg dalam 0,05 larutan oleum olivarum yang dimasukkan ke dalam rongga mulut mencit menggunakan alat jarum tumpul selama 4 minggu dengan interval 2 (dua) kali seminggu. Memasuki minggu ke 8 tampak tumbuh benjolan didaerah pipi dan sekitar telinga baik unilateral maupun bilateral. Pertumbuhan benjolan berkembang cepat seiring pertambahan waktu. Kondisi umum mencit semakin lemah. Bentuk benjolan tidak berbatas jelas dan tampak meluas ke jaringan sekitarnya. Keadaan ini sesuai dengan pendapat Kumar (1997) bahwa kanker mempunyai ciri khas tumbuh cepat dan invasi ke jaringan sekitarnya. Memasuki minggu ke 12 (dua belas) kondisi binatang semakin lemah namun masih bertahan hidup. Sesuai jadwal penelitian pada minggu ke 12 (dua belas) semua binatang dimatikan dan diambil mukosa rongga mulut beserta jaringan tumornya.

Diameter benjolan kanker dinyatakan dalam sentimeter (cm) diperoleh mean 0,4840 dan SD 0,0461.

Pertumbuhan benjolan kanker menurun dengan hasil mean diameter 0,2322 bila pada binatang coba yang terpapar B(a)P tersebut juga diberikan ekstrak teh hitam dosis 100 mg/kg BB pada pemberian ekstrak teh hitam dosis 80 mg/kg BB ternyata menurun juga dengan mean diameter agak besar yaitu 0,2975. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak teh hitam dapat menghambat per-tumbuhan tumor. Pada pemberian dosis ekstrak teh hitam yang lebih besar tampaknya pertumbuhan tumor lebih lambat. Keadaan ini bisa dipahami bila dikaitkan dengan laporan Shiraki et al (1994) dan Chen bersama Yen (1997) bahwa di dalam teh hitam terkandung substansi aktif polifenol biasa dikenal sebagai Theaflavin. Senyawa ini selain bersifat antioksidan juga antimutagenik. Mekanisme kedua sifat tersebut dapat dijabarkan sebagai berikut bahwa antioksidan teh dapat menurunkan kadar radikal bebas yang terbentuk akibat terpapar B(a)P sehingga meredam efek oksidatif akibat radikal bebas, maka kerusakan yang timbul baik pada membran sel maupun makromolekul lain termasuk DNA dapat diminimalkan dan kemungkinan timbulnya kanker dapat dihambat. Kemampuan antimutagenik dapat dijelaskan sebagai berikut pada waktu proses metabolisme B(a)P oleh enzim sitokrom P450 dihambat oleh ekstrak teh hitam, sehingga tidak terbentuk metabolit reaktif B(a)P yang karsinogenik. B(a)P untuk menjadi

senyawa yang karsinogen atau *ultimate carcinogen* harus dimetabolisme oleh sitokrom P450 menjadi senyawa epoksida. Senyawa epoksida ini dapat berikatan secara kovalen dengan DNA dan merusaknya. Kerusakan DNA atau mutasi DNA dapat memicu terbentuknya kanker. Dengan menghambat aktivitas metabolisme enzim sitokrom P450 maka terbentuknya senyawa epoksida ini dapat diminimalkan bahkan dicegah sehingga dapat mengurangi risiko terjadi mutasi DNA (Chen dan Yen, 1997). Bila kerusakan DNA atau mutasi mengenai gen dasar pengatur kanker antara lain gen protoonkogen, anti-onkogen atau supresor gen, dan gen pengatur apoptosis maka kemungkinan berubah menjadi kanker sangat besar. Selain 3 gen dasar tersebut ada juga gen yang sangat berperan yaitu gen pengatur *repair*, gen ini sangat penting, bila gen ini terganggu maka kemampuan untuk memperbaiki DNA menjadi tidak ada dan hal ini memicu terjadinya sel kanker sangat besar (Cotran, 1999).

Pemberian ekstrak teh hitam ini juga dapat mengungkap mekanisme imunopatobiologik. Untuk menjelaskan mekanisme ini sebaiknya dipahami lebih dahulu konsep imunopatobiologi. Konsep ini merupakan hasil pemahaman bahwa perubahan biologik sistem imun dari individu sebagai akibat interaksi dengan lingkungannya, meliputi perubahan yang menimbulkan patologik dalam hal ini timbul kanker dan perubahan sebagai

usaha untuk pengembalian homeostasis sel (Tjokroprawiro, 1997). Pada kondisi patologik yaitu setelah mencit dipapar B(a)P maka terjadi berbagai gangguan atau perubahan biologis dan kemungkinan juga terkena pada gen pengatur sistem imun. Hal ini mengakibatkan gangguan respons imun tubuh, sistem pertahanan atau perondaan terhadap berbagai antigen asing menjadi lemah. Bila gangguan sistem ketahanan imunologik terjadi terhadap keasingan atau non self sel pada kanker, maka dapat merupakan faktor predisposisi terjadinya perubahan suatu kanker yang manifes, Pernyataan ini didukung oleh pendapat Goodman (1991); Lehner (1992); Kumar (1997); Putra (1997). Dengan pemberian ekstrak teh hitam dimungkinkan terjadi perbaikan gen pengatur sistem imun tubuh dan perbaikan serta pengembalian homeostasis. Adanya perbaikan sistem imun, maka sistem perondaan terhadap berbagai keasingan meningkat termasuk sel kanker sehingga pertumbuhan kanker yang manifes dapat dicegah.

Pada hasil penelitian pada mencit yang terpapar B(a)P terjadi penurunan jumlah sel imunokompeten antara lain makrofag aktif dengan mean 1,0712 sel plasma aktif mean 0,8290 bila dibandingkan kelompok perlakuan yang diberi tambahan ekstrak teh hitam. Hal ini menunjukkan bahwa paparan B(a)P bukan hanya dirusaknya gen protoonkogen melainkan juga gen pengatur sistem imun. Efek imunomodulator ETH dapat dilihat pada mencit yang terpapar B(a)P juga



diberi ekstrak teh hitam baik pada dosis 100 mg/kg BB maupun 80 mg/kg BB tampak terjadi peningkatan sel imunokompeten bila dibandingkan dengan yang hanya terpapar B(a)P dan plasebo dengan perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ ). Keadaan ini dapat diasumsikan bahwa dengan pemberian ekstrak teh hitam dapat diperbaiki kerusakan sistem imunologik tubuh akibat paparan B(a)P. Hasil ini sesuai jika dikaitkan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Zhiraki (1994) bahwa ekstrak hitam dapat meningkatkan proliferasi sel B, sedangkan sel plasma aktif adalah hasil diferensiasi sel B atau maturasi sel B dengan produksinya imunoglobulin sebagai antibodi. Antibodi ini berperan dalam mekanisme sistem imun baik humoral maupun seluler. Efek sitolitik Antibodi terhadap sel kanker bergantung pada ikatan antara antibodi dengan Fc reseptor di permukaan makrofag atau sel NK. Fungsi efektor makrofag yang penting dalam sistem imunitas dapat baik sebagai antigen presenting sel (APC) untuk memulai respons imun, maupun aktivator terhadap sel limfosit T (T helper dan T sitotoksik) perannya juga sebagai pemakan atau fagositosis dan sekresi protein yang bersifat sitolitik sehingga dapat menghancurkan benda asing dalam tubuh (Abbas 1994; Stites, 1997; Cotran, 1999). Pada penelitian ini dihasilkan peningkatan jumlah makrofag aktif, terutama pada kelompok perlakuan yang diberi ETH dosis 100 mg/kg BB. Pernah pula dilaporkan oleh Zhiozaki (1997) bahwa dosis 100

mg/kg BB ekstrak teh hitam yang diberikan peroral pada mencit dapat menghambat alergi tipe I. Tampak nya ETH pada dosis 100 mg/kg BB mampu memperbaiki atau memodulator sistem imun baik, maka potensi respon imun baik humoral maupun seluler dapat ditingkatkan. Peranan makrofag sebagai sel imunokompeten respons imun seluler terhadap kanker sangat besar, oleh karena makrofag aktif ini mempunyai kemampuan membunuh atau fagositosis zat asing. Makrofag aktif juga terjadi peningkatan produksi enzim hydrolitik, lisosim sebagai substansi makrobisidal, selain itu akan disekresi substansi sitotoksik yaitu TNF alfa yang dapat menghancurkan sel kanker dan metabolit oksigen toksik serta *nitric oxyde* sebagai anti replikasi. Mekanisme makrofag dalam membunuh sel kanker dapat secara langsung melalui membran reseptornya atau dengan mengadakan ikatan bersama antibodi sebagai ADCC.

Telah banyak dilaporkan oleh peneliti bahwa perondaan sistem imun ikut menentukan terbentuknya kanker. Pernyataan tersebut diperkuat dengan pembuktian pada penderita dengan defisiensi imun akan timbul kanker sekitar 200 kali lebih banyak (Robbin, 1992). Analoginya pada penerima cangkokan yang mengalami supresi imun menunjukkan peningkatan frekuensi kanker dikutip dari Robbin, (1992). Pada penelitian ini diperoleh hasil bahwa mencit yang dipapar benzopirene dan telah timbul kanker ternyata sistem imunnya mengalami supresi, hal ini dibuktikan terjadi penurunan jumlah sel

makrofag aktif dan sel plasma aktif. Keadaan tersebut dapat dikaitkan dengan laporan Hardyn (1992) bahwa B(a)P dapat menyebabkan imunosupresi.

Pada pemberian ekstrak teh hitam dosis 80 mg/kg BB bila dikaitkan dengan nekrosis sel kanker yang terjadi maka diperoleh hasil lebih besar Mean 1,6905), sedangkan mitosis dengan Mean 1,0275, diameter tumor mean 0,2975. Sedangkan keadaan yang terjadi pada mencit dengan diberikan ekstrak teh hitam dengan dosis 100 mg/kg BB, nekrosis juga justru lebih kecil, namun mitosis lebih sedikit dan diameter tumor mengecil. Hal ini disumsikan bahwa kanker mempunyai sifat yang heterogenitas dan penyebab pertumbuhannya multifaktorial. Nekrosis pada sel kanker dapat terjadi baik melalui mekanisme hipoksia atau lisis oleh sel imunokompeten. Mekanisme hipoksia pernah dilaporkan Robbins (1992) bahwa pada kanker di daerah hypofise lambat laun menjadi hilang dengan sendirinya, karena pada daerah itu lokasinya terjepit sehingga suplay darah atau oksigen ke daerah tersebut tidak ada dan kemudian mengalami nekrosis. Jaringan yang tidak mendapat suplay darah akan mengalami denaturasi protein oleh enzim lisosom baik berasal dari sel itu sendiri maupun dari sel imigran. Sel Imunokompeten yang aktif seperti hanya makrofag, limfosit T dan sel NK akan mensekresi enzim sitolitik. Dengan meningkatnya aktivitas sel makrofag maka akan meningkatkan efek sitolisis atau

kematian sel kanker. Kematian sel kanker bukan hanya melalui nekrosis namun juga dapat disebabkan oleh apoptosis. Mekanisme ini dapat dijelaskan sebagai berikut bahwa TNF alfa yang disekresi makrofag dapat dikenali oleh protein reseptor apoptosis yaitu sebagai TRADD (*TNFR adaptor protein with a death domain*), hal ini memicu terjadinya apoptosis. Mengingat berbagai faktor penyebab terjadinya kematian sel pada kanker maka peningkatan yang lebih besar pada pemberian ETH dengan dosis 80 mg/kg BB bisa dipahami. Hal ini didukung oleh laporan Robbin (1992), Kumar (1997) dan contran (1999) bahwa kematian sel dapat melalui mekanisme nekrosis dan apoptosis. Bila dikaitkan dengan pengecilan diameter tumor maka hal ini bukan hanya di-sebabkan oleh peningkatan nekrosis saja namun berbagai faktor lain. Kemungkinan pengecilan diameter tumor pada penelitian ini bukan hanya disebabkan oleh kematian sel saja namun sebagai usaha perbaikan homeostasis dan mekanisme antimutagenik, dapat dilihat jumlah mitosis sel kanker pada penelitian ini maka pemberian ETH dosis 100 mg/kg BB terjadi penurunan yang lebih banyak. Hal ini dapat dipahami karena ETH mampu menghambat efek mutagenik B(a)P, sehingga mengurangi terbentuknya mutan sel. Dikatakan pula oleh Cotran (1999) bahwa makrofag aktif mengeluarkan produk *nitric oxyde* yang dapat menghambat replikasi sel tumor. Seperti telah di-

jelaskan pada bab sebelumnya bahwa proses terjadinya kanker akibat akumulasi mutasi. Bila mutasi dapat dihambat atau dikurangi maka proses karsinogenesis juga dicegah sehingga kemampuan pembelahan sel atau mitosis diminimalkan. Selain itu dihasilkan metabolit yang bersifat toksik oksigen sehingga menghambat terbentuknya mutan.

Masalah respons imun terhadap sel kanker atau sebaliknya keberadaan sel kanker terhadap sistem imun masih perlu dilakukan penelitian yang intensif untuk dapat dipecahkan. Seperti telah dijelaskan sebelumnya bahwa sel kanker tidak menunjukkan antigen tertentu yang spesifik sehingga hal ini sering menyebabkan lepasnya dari pengawasan sistem imun. Berawal dari heterogenitas ekspresi antigen sel kanker maka imunoterapi terhadap kanker masih menjadi suatu hal yang perlu diteliti dan dikembangkan secara terus menerus. Walaupun demikian, namun kenyataannya pada penelitian telah dibuktikan terjadi : perbaikan sistem imun dan peranannya terhadap penurunan progresivitas kanker. Kemungkinan hal ini timbulnya kanker yang disebabkan oleh B(a)P dapat mengekspresikan antigen spesifik sehingga dapat dikenali oleh sistem imun atau pemberian ekstrak teh hitam dapat berperan sebagai modulator respons imun, juga antimutagenik. Pada penelitian ini juga dihasilkan berbagai jenis kanker antara lain karsinoma sel skuamus, fibrosarkoma, malignant fibro histiocyoma dan Rhabdomyosarkoma, hal ini kemungkinan ada-

nya berbagai sel target karena paparan bahan karsinogen benzopirene, tentunya perlu pembuktian lebih lanjut.

# BAB 7

## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

1. Ekstrak teh hitam dapat meningkatkan aktivitas ketahanan imunologik seluler mukosa mulut mencit yang terpapar benzopirene
2. Ekstrak teh hitam dapat menghambat progresivitas tumor mukosa rongga mulut mencit yang terpapar benzopirene

#### 7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih ketinggian biomolekuler terhadap biokativitas teh hitam terutama dalam kaitannya dengan mekanisme sistem imun
2. perlu dilakukan penelitian lebih ketinggian biomolekuler bioaktivitas teh hitam dalam kaitannya dengan karsinogenesis
3. Perlu dilakukan pengembangan pemanfaatan teh hitam sebagai bahan imunoterapi dan kemoterapi
4. Perlu dipikirkan upaya pemecahan masalah terhadap penanggulangan kanker secara dini terutama akibat paparan B(a)P.



# DAFTAR PUSTAKA

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas.AK; Lichtman. AH and Pober JS, 1994. Cellular and Molecular Immunology, 2<sup>nd</sup> ed, Philadelphia WB. Saunders Co : 21 - 375.
- Bellanti Joseph.A, 1993. Immunobiologi Umum in Bellanti (ed) Immunology III. Terjemahan Samik Wahab dan Noerhajati Soeripto. Gajah Mada Upress : 18-57.
- Beng Tjiang Jap. 1996. Manfaat teh ditinjau dari sudut Farmakologi. Makalah Ilmiah dalam Seminar Teh di Bandung. Disadur oleh Asosiasi Teh Indonesia, Sekretariat Bandung.
- Budhy.T.I, 1995. Analisis tumor Ganas Rongga Mulut di Jawa Timur. Edited Journal Kongres PDGI ke XIX, Balikpapan : 131-143.
- Constantinides Paris, 1994. General Pathobiology. 1<sup>st</sup> edition. Norwalk : Appleton and Lange Co : 239-288.
- Cotran.R.S; Kumar.V and Collins. T, 1999. Pathologic Basis of Disease. 6<sup>th</sup> ed..Philadelphia, WB Saunders Co : 260 - 328.

- Chen HY and Yen GC, 1997. Possible Mechanims Aspects of Antimutagens by various teas as judged by their effects on mutagenesis by 2 - amino - 3 - methylimidazo (4,5 - f) quinoline and Benzo (a) pyrene. *Mutat Res*, 393 (1-2); Sep 18 : 115 - 22.
- Chung FL, 1999. The preventive of lung cancer induced by tobacco - specific carcinogen in rodents by green and black tea; *Proc Soc Exp Biol Med*, apr; 220 (4) : 224 - 8.
- Dalgleish A.G and Browning, 1996. The Immunosurveillance of cancer in Tumor Immunology. *Cancer Clinical Science in Practice 1. Opinion in Immunology* : 613-18.
- Gorsky, 1994. The Prevalence of Oral Cancer in relation to the ethnic origin of israeli jaws. *Oral Surg - Oral Med - Oral Pathol*. Sep. 78 (3) : 408 - 11.
- Goodman JW, 1991. Immune Respons. In *Basic Human Immunology*, 1<sup>st</sup> edition, edited by Daniel p Sstites and Alba I Terr, Prentice Hall International Inc : 34 - 44.
- Hardyn.J.A, 1992. Mecanism by which Benzopyrene and Environment al carcinogen, Supresses B cell lymphotesis. *Toxicol, Appl Pharmacoll*, 117 (2) : 155-164.

- Harris. 1991. Biological Markers in The Molecular Epidemiological models. In Agency For Toxic Substances and Disease Registry Public Health Statement. Di akses dari [http://www.atsdr.cdc.gov/Tox Profiles/phs 8805. Html](http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/phs8805.html). Tanggal akses : 2-6-1999.
- Heidi,R, 1995. Poliphenol as antioxidant, Journal Sciences News quated, Rutger University, Juli 1 : 164 - 9.
- Huang.M.T; Xie,JG; Wang,Zy; Ho, CT ; Lou; Wang CX : Hard GC and Conney AH, 1997. Effect of tea decaffeinated tea, and caffeine on Uvb light induced complete carcinogenesis in SKH 1 mice. Cancer-Ress, juli, 57 (13) : 2623-9.
- Higgins JE, 1985. Design Methodology For Randomized Clinical Trial, Family Health International, North Caroline : 27-32.
- Hu,Zq; Toda,M : Okubo,S : Hara,Y and Shiamamum, T, 1992. Mitogenic Activity of Epigallocatechin gallate on B cells, and investigation of its structure-function relationship. Int - J - Immunopharmacol, Nov, 14 (8) : 1399-407.
- Junzhi Ding, 1991. How the tea affects your health (chi), Lin Nansong, (11), (2).

- Katiyar, S.K and Mukhtar H, 1997. Inhibition of phorbol ester tumor promotor 12-O-tetradecanoyl phorbol - 13 - acetate caused inflammatory responses in cancer mouse skin by black tea polyphenol. *Carcinogenesis*. Oct, 18 (10) : 1911-16.
- Khotib, J, 1998. Pengaruh pemberian beta karoten dan kombinasi Vit.E-Vit C terhadap kanker mencit yang diinduksi Benzopirene. Tesis Program Pascasarjana UNAIR. Surabaya.
- Kim, JH; Stansbury, KH; Walker NJ; Trush, MA; Strickland PT and Sutter TR, 1998. Metabolism of B(a)P and B(a)P - 7,8 diol by human cytochrome P450. *Cancer Res*, Nov, 10(1)
- Kumar V; and Robbins, S.L., 1997. *Basic Pathology*. Tokyo WB.Saunders Company, 132-174.
- Li D; Wang, M; cheng, L; Spitz, MR; Hittelman WN and Wei, Q, 1996. In Vitro Induction of Benzopyrene diolepoxide-DNA Addults in peripheral lymphocytes as a susceptibility marker for human lung cancer, *Cancer Res*, Aug 15(56): 16 3638-41.
- Lehner, L, 1992. *Immunology of Oral Diseases*, 3 th ed. Blackwell Scientific Publication.

- Maat.S, 1995. Pengujian Bioaktivitas Tanaman Obat Sebagai antikanker. Fakultas Kedokteran UNAIR, Edited oleh Program Pascasarjana UNAIR Surabaya, Upres Unair.
- Mendelson,J; Howley,P.M; Israel,M and Liotta,L.A. 1995. Tumor Supressor Genes. In the Molecular Basis of Cancer.Edited by WB Saunders Co, Philadelphia : 86-100.
- McGhee, JR; Srobes, Waren; Fujihachi, K and Kiyond, H., 1993. Mucosal Immunology Intra-epithelial lymphocytes, edited by Kiyono H and Mc Ghee JR. New York , Raven Press.:4-15.
- Mukhtar.H dan Ahmad.N.1999. Mechanism of Cancer Chemo-preventive Activity of Green Tea. The Society For Experimental Biology and Medicine. University Hospital of Cleveland, edited by Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, 44106 : 234 - 238.
- Okabe. S; Ochiai. Y; Aida M; Park.K; Kim SJ; Nomura T; Suganuma M and Fujiki H., 1999. Mechanistic Aspects of tea as a cancer preventive, Jpn Cancer Res.
- Pudjiastuti, P. ;Santoso MH and Sukardiman, 1997. Uji Aktivitas Antitumor Triterpen dari kulit batang kecapi kera pada sistem kultur sel tumor hasil induksi benzopirene pada mencit. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya.

- Putra ST, 1997. Biologi Molekuler Kedokteran Gigi edisi pertama, Airlangga University Surabaya Press : 59 - 89.
- Rasko, I and Stephen Downes, C., 1995. Genes in Medicine Molecular biology and human genetic disorders. London ; Chapman & Hall : 11.1 - 11.17.
- Robbins S.2; Kumar,V. 1992. Neoplasia. In Robbins (ed) Basic Pathology. Alih Bahasa Staf Pengajar Lab.Patologi Anatomi FK Unair. Penerbit EGC. : 203-238.
- Roitt.T; Brostoff-J and Male.D, 1996 : Immunology, 4<sup>th</sup> ed, London, Mosby Co : 201-208.
- Schroeder. H, 1991. Oral Structural Biology, New York, Thieme Medical Publishersn Inc : 350-385.
- Shiraki M; Hara Y; Osawa T; Kumon H; Nakayama T and Kawakishi. S, 1994. Antioxidative and Antimutagenic Effects of Theaflavin from Black Tea, Mutat Res ; Jan-Feb; 323 (1-2): 29 - 34.
- Shi,ST; Wang,ZY; Smith, TJ; Hong, JY; Chen, WF, HO,CT; Yang CS, 1994. Effects of green tea and Black tea on NNK bioactivation, DNA metylation, and Lung Tumorigenesis in A/J mice. Cancer-Res. Sept 1. 54 (M) : 4641.
- Stites. D; Terr.AI and Parslow.T., 1997. Medical Immunology. 9<sup>th</sup> ed, Prentice-Hall International Inc : 631 - 639.



- Sugiyanto, 1992. Karsinogenesis kimiawi. Kursus singkat Onkologi, PAU Bioteknologi. Universitas Gajah Mada Jogjakarta, 3 Feb :49-169.
- Suryo, 1994. Genetika Manusia. Cetakan ke 4. Gajah Mada U.Pres: 57-75.
- Soeparto P, Indajana FM, Putra ST dan sudarmo SM., 1997. Imunologi Mukosal Kedokteran. Edited oleh Gramik FK Unair, Surabaya,:49-169.
- Subowo, 1993. Fagositosis dalam Immunobiologi, Bandung : Angkasa Press : 151-65.
- Suryohudoyo.P, 1993. Oksidan, Antioksidan dan Radikal bebas. Simposium oksidan dan Antioksidan , Surabaya, 28 Agustus : 37 - 50.
- Tsushinsha Jiji, 1982. Japan Health Promotion Foundation. For cities, Major Diseases Mortalities, Town and Villages in Japan (1969-1978).
- Yang. SC and Wang, 1999. The Chemistry of Tea From Tea and Cancer. [http : //www. Teataalk.Com/Science/Chemistry.htm](http://www.Teataalk.Com/Science/Chemistry.htm), akses 24-5-1999.
- Yoshino, Yogi; Hara, Yukihiro; Sano, Mitsuaki and Tomita, Isac, 1994. Antioxidative Effects of Black tea Theaflavin and Therabugin on Lipid peroxidation of Rat Liver Homogenitas Induced by tetra Butyl Hydroperoxide. Biol Pharm Bull. 17 (1): 146-149.



Zhiozaki. T., 1997. Effect of tea extracts, catechin and caffeine against type I allergic reaction, *Yakugaku-Zasshi*. Jul. 147.

Webrnaster (a) coe, com, 1996. Chemical Compounds in tea leaves and their Health benefits, copyright 1996. All Rights Reserved, Creative on line Enterprises; di akses tanggal 25-03-1997.

# LAMPIRAN

c. Aspas wintharasia

	makrofag	plasma	nekrosis	mitosis	diarnater	treatman
1	.00	1.00	.00	.00	.00	1.00
2	.00	2.00	.00	.00	.00	1.00
3	1.00	.00	.00	.00	.00	1.00
4	.00	.00	.00	.00	.00	1.00
5	.00	2.00	.00	.00	.00	1.00
6	.00	1.00	.00	.00	.00	1.00
7	.00	1.00	.00	.00	.00	1.00
8	.00	1.00	.00	.00	.00	1.00
9	13.00	7.00	20.00	20.00	3.00	2.00
10	13.00	7.00	10.00	9.00	3.50	2.00
11	10.00	4.00	40.00	30.00	3.50	2.00
12	14.00	9.00	10.00	36.00	2.50	2.00
13	28.00	9.00	10.00	44.00	3.00	2.00
14	4.00	6.00	30.00	25.00	3.00	2.00
15	10.00	5.00	20.00	27.00	3.00	2.00
16	14.00	9.00	20.00	27.00	3.00	2.00
17	172.00	30.00	60.00	14.00	2.00	3.00
18	172.00	30.00	30.00	.00	2.50	3.00
19	183.00	33.00	30.00	5.00	2.00	3.00
20	217.00	36.00	30.00	7.00	2.00	3.00
21	167.00	25.00	30.00	6.00	1.50	3.00
22	155.00	21.00	30.00	10.00	2.00	3.00
23	223.00	36.00	38.00	7.00	2.00	3.00
24	109.00	31.00	38.00	7.00	2.00	3.00
25	143.00	33.00	90.00	10.00	3.00	4.00
26	143.00	33.00	30.00	22.00	2.00	4.00
27	267.00	42.00	70.00	9.00	1.50	4.00
28	250.00	39.00	70.00	9.00	2.00	4.00
29	92.00	30.00	30.00	7.00	1.00	4.00
30	29.00	27.00	30.00	11.00	1.00	4.00
31	120.00	31.00	53.00	11.00	2.00	4.00
32	103.00	27.00	53.00	11.00	2.00	4.00

ANALISIS : DESKRIPSI VARIABEL RESPON IMUN DAN CANCER  
 PADA (Pemberian Placebo, Bp, Bp+t1, Bp+t2)

---

Variable MAKROFAG

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean	
Grp 1	8	.0000	.0000	.0000	.0000	TO .0000
Grp 2	8	1.0712	.2350	.0831	.8747	TO 1.2676
Grp 3	8	2.2273	.0959	.0339	2.1471	TO 2.3075
Grp 4	8	2.0817	.3005	.1062	1.8305	TO 2.3329
Total	32	1.3450	.9285	.1641	1.0103	TO 1.6798

GROUP	MINIMUM	MAXIMUM
Grp 1	.0000	.0000
Grp 2	.6021	1.4472
Grp 3	2.0374	2.3483
Grp 4	1.4624	2.4265
TOTAL	.0000	2.4265

Variable PLASMA

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean	
Grp 1	8	.3010	.0023	.0000	.3010	TO .3010
Grp 2	8	.8290	.1301	.0460	.7202	TO .9378
Grp 3	8	1.5103	.0690	.0244	1.4526	TO 1.5680
Grp 4	8	1.4746	.0799	.0282	1.4078	TO 1.5414
Total	32	.9723	.6029	.1066	.7549	TO 1.1897

GROUP	MINIMUM	MAXIMUM
Grp 1	.0000	.3010
Grp 2	.6021	.9542
Grp 3	1.4314	1.6232
Grp 4	1.3222	1.5563
TOTAL	.0000	1.6232

ANALISIS : DESKRIPSI VARIABEL RESPON IMUN DAN CANCER  
 PADA (Pemberian Placebo, Bp, Bp+t1, Bp+t2)

Variable NEKROSIS

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean		
Grp 1	8	.0000	.0000	.0000	.0000	TO	.0000
Grp 2	8	1.2478	.2302	.0814	1.0554	TO	1.4402
Grp 3	8	1.5560	.1477	.0522	1.4326	TO	1.6795
Grp 4	8	1.6905	.1913	.0676	1.5306	TO	1.8505
Total	32	1.1236	.6972	.1233	.8722	TO	1.3750

GROUP	MINIMUM	MAXIMUM
Grp 1	.0000	.0000
Grp 2	1.0000	1.6021
Grp 3	1.4771	1.9031
Grp 4	1.4771	1.9542
TOTAL	.0000	1.9542

Variable MOTOSIS

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean		
Grp 1	8	.0000	.0000	.0000	.0000	TO	.0000
Grp 2	8	1.3991	.2071	.0732	1.2260	TO	1.5722
Grp 3	7	.8798	.1483	.0561	.7426	TO	1.0170
Grp 4	8	1.0275	.1437	.0508	.9074	TO	1.1476
Total	31	.8249	.5480	.0984	.6239	TO	1.0259

GROUP	MINIMUM	MAXIMUM
Grp 1	.0000	.0000
Grp 2	.9542	1.6435
Grp 3	.6990	1.1461
Grp 4	.8451	1.3424
TOTAL	.0000	1.6435

Variable DIAMETER

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean		
Grp 1	8	.0000	.0000	.0000	.0000	TO	.0000
Grp 2	8	.4840	.0461	.0163	.4454	TO	.5225
Grp 3	8	.2322	.1647	.0582	.0945	TO	.3699
Grp 4	8	.2975	.0596	.0211	.2477	TO	.3474
Total	32	.2534	.1957	.0346	.1828	TO	.3240

GROUP	MINIMUM	MAXIMUM
Grp 1	.0000	.0000
Grp 2	.3979	.5441
Grp 3	.0000	.4771
Grp 4	.1761	.3979
TOTAL	.0000	.5441

ANALISIS : PERBEDAAN RESPON IMUN PADA PERLAKUAN  
(Pemberian Placebo, Bp, Bp+t1, Bp+t2)

\*\*\*\*\* Analysis of Variance \*\*\*\*\*

32 cases accepted.  
0 cases rejected because of out-of-range factor values.  
0 cases rejected because of missing data.  
4 non-empty cells.  
  
1 design will be processed.

Variable	CELL NUMBER			
	1	2	3	4
TREATMEN	1	2	3	4

Univariate Homogeneity of Variance Tests

Variable .. LMAKRO

Cochrans C(7,4) = .58364, P = .019 (approx.)  
1 Cell has zero variance, Bartlett-Box test cannot be done.

Variable .. LPLASMA

Cochrans C(7,4) = .40880, P = .370 (approx.)  
Bartlett-Box F(3,1411) = 1.51662, P = .208

Cell Number .. 1

>Note # 12171  
>Singular variance-covariance matrix for this cell.

Cell Number .. 2

Determinant of Covariance matrix of dependent variables = .00065  
LOG(Determinant) = -7.32606

\*\*\*\*\* Analysis of Variance -- design 1\*\*\*\*\*

Cell Number .. 3

Determinant of Covariance matrix of dependent variables = .00005  
 LOG(Determinant) = -9.90979

Cell Number .. 4

Determinant of Covariance matrix of dependent variables = .00012  
 LOG(Determinant) = -9.05979

0 cells with only one observation.  
 1 cell with singular Variance-Covariance matrix.

Determinant of pooled Covariance matrix of dependent vars. = .00033  
 LOG(Determinant) = -8.02366

Multivariate test for Homogeneity of Dispersion matrices

Boxs M = 15.57269  
 F WITH (6,10991) DF = 2.23699, P = .037 (Approx.)  
 Chi-Square with 6 DF = 13.43041, P = .037 (Approx.)

## LAMPIRAN 6

ANALISIS : PERBEDAAN RESPON IMUN PADA PERLAKUAN  
(Pemberian Placebo, Bp, Bp+t1, Bp+t2)

\*\*\*\*\* Analysis of Variance -- design 1\*\*\*\*\*

EFFECT .. TREATMEN

Multivariate Tests of Significance (S = 2, M = 0, N = 12 1/2)

Test Name	Value	Approx. F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	1.12956	12.11188	6.00	56.00	.000
Hotellings	39.92056	172.98911	6.00	52.00	.000
Wilks	.02076	53.45797	6.00	54.00	.000
Roys	.97545				

Note.. F statistic for WILKS' Lambda is exact.

EFFECT .. TREATMEN (Cont.)

Univariate F-tests with (3,28) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
LMAKRO	25.64125	1.08275	8.54708	.03867	221.02759	.000
LPLASMA	10.93597	.33251	3.64532	.01188	306.96987	.000



ANALISIS : PERBEDAAN CANCER PADA PERLAHUAN  
 (Pemberian Placebo, Bp, Bp+t1, Bp+t2)

\*\*\*\*\* Analysis of Variance \*\*\*\*\*

31 cases accepted.  
 0 cases rejected because of out-of-range factor values.  
 1 case rejected because of missing data.  
 4 non-empty cells.  
  
 1 design will be processed.

Variable	CELL NUMBER			
	1	2	3	4
TREATMEN	1	2	3	4

Univariate Homogeneity of Variance Tests

Variable .. LNEKROSI

Cochrans C(7,4) = .46531, P = .167 (approx.)  
 1 Cell has zero variance, Bartlett-Box test cannot be done.

Variable .. LMOTOSIS

Cochrans C(7,4) = .50131, P = .094 (approx.)  
 1 Cell has zero variance, Bartlett-Box test cannot be done.

Variable .. LDIAMETE

Cochrans C(7,4) = .86175, P = .000 (approx.)  
 1 Cell has zero variance, Bartlett-Box test cannot be done.

Cell Number .. 1

>Note # 12171  
 >Singular variance-covariance matrix for this cell.

Cell Number .. 2

Determinant of Covariance matrix of dependent variables = .00000  
 LOG(Determinant) = -12.92042

\*\*\*\*\* Analysis of Variance -- design 1\*\*\*\*\*

Cell Number .. 3

Determinant of Covariance matrix of dependent variables = .00000  
 LOG(Determinant) = -14.62532

Cell Number .. 4

Determinant of Covariance matrix of dependent variables = .00000  
 LOG(Determinant) = -12.70971

0 cells with only one observation.  
 1 cell with singular Variance-Covariance matrix.

Determinant of pooled Covariance matrix of dependent vars. = .00001  
 LOG(Determinant) = -11.58624

Multivariate test for Homogeneity of Dispersion matrices

Boxs M = 35.43796  
 F WITH (12, 1848) DF = 2.29033, P = .007 (Approx.)  
 Chi-Square with 12 DF = 27.71403, P = .006 (Approx.)

## LAMPIRAN 9

ANALISIS : PERBEDAAN CANCER PADA PERLAKUAN  
(Pemberian Placebo, Bp, Bp+t1, Bp+t2)

-----

\* \* \* \* \* Analysis of Variance -- design 1 \* \* \* \* \*

EFFECT .. TREATMEN

Multivariate Tests of Significance (S = 3, M = -1/2, N = 11 1/2)

Test Name	Value	Approx. F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	1.92991	16.23161	9.00	61.00	.000
Hotellings	33.40486	87.84241	9.00	71.00	.000
Wilks	.00442	56.12960	9.00	60.99	.000
Roys	.96435				

-----

EFFECT .. TREATMEN (Cont.)

Univariate F-tests with (3,27) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
LNEKROSI	14.16868	.77263	4.72289	.02862	165.04363	.000
LMOTOSIS	8.43088	.57665	2.81029	.02136	131.58500	.000
LDIAMETE	.94810	.21816	.31603	.00808	39.11358	.000

-----

## Lampiran 10

Pemulasan D-PAS (Diastase Periodic Acid Schiff)

Pengecatan PAS mempunyai dua reagen penting yaitu :

1. Asam periodat yang berfungsi sebagai oksidator. Asam ini mengoksidasi ikatan rantai karbon pada ikatan 1,2 glikol sehingga terbentuk gugus aldehyd. Gugus aldehyd mempunyai afinitas dengan cat Schiff yang besar.
2. Reagen Schiff, reagen ini mempunyai gugus Fuchsin Sulphurous acid yang memberikan warna merah magenta. Hasil pengecatan imunoglobulin dengan PAS pada sel plasma memberikan gambaran bercak merah di seluruh sitoplasma bahkan inti sel atau bercak besar berwarna merah pada sitoplasma bahkan inti sel. Bila pengecatan tersebut didahului dengan pemberian enzim diastase ternyata komponen karbohidrat tidak rusak sehingga hasil pengecatan PAS tetap positif. Resistensi imunoglobulin terhadap diastase dapat dipahami sebab karbohidrat yang terdapat pada imunoglobulin mempunyai karbohidrat tak bebas. Sedangkan substrat diastase adalah polisakarida bebas.

**B. Tehnik Pemulasan :**

1. Defaranisasi : xylol, alkohol abs, alkohol 95%, alkohol 80%, alkohol 70%.
2. Air
3. PBS
4. Inkubasi dalam larutan diastase di oven (0,1%) pada 37°C (15-30 menit). Diastase (enzim) 0,1 gr dalam 100 cc PBS.
5. PBS
6. Air
7. Periodic acid (0,5%) → 15-30 menit (P4 Cryst 0,5 gr dalam 100 CC aquadest)
8. PBS
9. Air
10. Schiff 15-30 menit
11. Cuci air
12. Harris Hematoksil 12 menit
13. Acid alkohol (1%) 3 celup  
HCl pekat 1 cc dalam 100 cc alkohol 70%.
14. Air
15. Amoniak air (0,2%) 3 celup  
NH<sub>4</sub>OH (28%) 0,2 cc dl 100 cc air
16. Air
17. Rehidrasi (alkohol 90%), 95% absolut
18. Xylol
19. Mounting



## Lampiran 11

Pemulasan Aldehyde Fuchsin Methode menurut Gomeri

### A. Mempunyai 3 reagen penting

1.  $\text{KMnO}_4$  1% fungsi sebagai oksidator.
2. Aldehyde fuchsin : memberikan warna kecoklatan pada vesikula pinositik sitoplasma makrofag, berupa peningkatan jumlah granul berwarna kecoklatan tersebar di sitoplasma.
3. Counter Stain Van Gieson

### B. Teknik Pemulasan

1. Deparafinisasi
2. Cuci dengan air
3. Oksidasi dengan 1%  $\text{KMnO}_4$  selama 5 menit
4. Cuci dengan air mengalir
5. Penghilangan  $\text{KMnO}_4$  dengan pemberian asam oksalat, 1%
6. Cuci dengan air mengalir
7. Cuci dengan ethanol 70%
8. Diinkubasi dalam Aldehyde Fuchsin selama 15 menit
9. Cuci dalam ethanol 70%
10. Cuci dengan air mengalir
11. Van Gieson sebagai counter stain
12. Dehidrasi dengan alkohol
13. Masukkan xylol
14. Mounting dengan enthelan

## Lampiran 12

## Pemulasan Hematoksilin Eosin.

Pada pemulasan ini, inti sel yang tercatat berwarna kebiru-biruan.

Proses pemulasan :

1. Deparafinisasi dengan xylol		15 menit
2. Hidrasi dengan alkohol 96%		2 menit
	alkohol 95%	2 menit
	alkohol 80%	2 menit
	air mengalir	10 menit
3. Cat utama	Hematoksilin meyer	10 menit
	air mengalir	15 menit
4. cat pembanding	Eosin	1,5 menit
5. Hidrasi dengan alkohol 80%		5 celup
	alkohol 95%	5 celup
	alkohol 86%	2 menit
6. Dikeringkan		1 menit
7. Clearing	xylol	10 menit
	xylol	5 menit
8. Mounting	Entelan	5 menit