



Pengaruh Pemberian Ekstrak *Phyllanthus niruri* Linn Terhadap Infiltrasi Limfosit dan Ekspresi Perforin pada Kanker Kolon Tikus *Sprague-Dawley*

Endang Sawitri *, Ign. Riwanto **, Tjahjono ***, Edi Dharmana ****

ABSTRACT

The effect of Phyllanthus niruri Linn extract on lymphocytes infiltration and perforin expression in colon cancer of Sprague-Dawley Rat

Background: Colon cancer treatment currently involves immunotherapy that aims to improve the quality of life and survival of patients. *Phyllanthus niruri* Linn (*P. niruri* L) may act as an immunomodulator, but its potency in antitumor immune responses has not been revealed. The study was conducted to evaluate the differences between the immunological status of rats suffering colon cancer which were not given to those given the extract of *P. niruri* L.

Methods: The study was randomized posttest-only control group design. Samples were 30 Sprague-Dawley male rats, bodyweight 170-220 gr which induced by 1,2 DMH 30 mg/kgBW subcutaneously. On the weeks 9, 11 and 13, four induced rats each week were sacrificed to detect the development of colon cancer. On the weeks of 13th all of 4 rats were developed colon cancer, so the induction were stopped. The rest of 18 induced rats were randomly into two groups: without *P. niruri* L or positive control (K+)=9 rats and given *P. niruri* L extract 13.5 mg/kg orally or X group=9 rats. After 19th week all of rats were then terminated and tumor lesion of colon were processed histopathologically. The tissues of colon cancer were stained by H&E for evaluate the lymphocytes infiltration and immunohistochemistry monoclonal antibody anti-perforin for perforin expression. Non pairs t-test was used with considered significant if $p < 0.05$.

Results: The mean of lymphocytes infiltration of the group X was 401.89 ± 70.19 , it was higher compared to K+ 191.89 ± 50.68 ($p=0.000$). The mean percentage of perforin expression of group X was $39.00 \pm 1.80\%$, it was higher compared to K+ $23.00 \pm 3.00\%$ ($p=0.000$).

Conclusion: The extract of *P. niruri* L increases immunologic status through mechanism of lymphocytes infiltration and perforin expression elevation of colon cancer in animal mode.

Keywords: *Phyllanthus niruri* Linn, colon cancer, lymphocytes infiltration, perforin.

ABSTRAK

Latar belakang: Penanganan kanker kolon saat ini melibatkan imunoterapi yang bertujuan untuk meningkatkan kualitas hidup dan survival penderitanya. *Phyllanthus niruri* Linn bekerja sebagai imunomodulator, tetapi potensinya dalam respons imun antitumor belum banyak diungkap. Penelitian bertujuan untuk mengevaluasi perbedaan status imunologis antara tikus coba yang menderita kanker kolon yang tidak diberi dengan yang diberi ekstrak *P. niruri* L.

Metode: Penelitian ini merupakan randomized posttest-only control group design. Sampel berupa 30 ekor tikus Sprague-Dawley jantan, yang diinduksi 1,2 DMH 30 mg/kgBB subkutan sekali setiap minggu. Pada minggu ke-9, 11 dan 13 masing-masing empat ekor tikus dimatikan untuk melihat perkembangan tumor. Minggu ke-13 pada kolon empat tikus telah tumbuh kanker kolon, sehingga induksi dihentikan dan sisa 18 tikus dirandom alokasi menjadi 2 kelompok. Kelompok kontrol positif (K+) tanpa pemberian *P. niruri* L (9 tikus) dan kelompok diberi *P. niruri* L. 13,5 mg/kg per hari melalui sonde (9 tikus). Minggu ke-19 semua tikus diterminasi, lesi tumor pada kolon diproses menjadi sediaan histopatologik, kemudian dipulas dengan H&E untuk memeriksa

* Bagian Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman, Jl. Krayan Kampus Gunung Kelua Samarinda

** Bagian Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi, Jl. Dr. Sutomo 16-18 Semarang

*** Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi, Jl. Dr. Sutomo 16-18 Semarang

**** Bagian Parasitologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Jl. Prof. H. Soedarto, SH, Tembalang Semarang

infiltrasi limfosit dan pulasan imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal anti-perforin untuk melihat ekspresi perforin. Analisis data menggunakan uji *t* tidak berpasangan dengan derajat signifikansi $p < 0,05$.

Hasil: Rerata jumlah infiltrasi limfosit kelompok X adalah $401,89 \pm 70,19$ lebih tinggi dibanding kelompok K+ yaitu

PENDAHULUAN

Kanker kolon sampai saat ini masih menempati urutan kanker ketiga terbanyak di dunia, setiap tahun diperkirakan terjadi satu juta kasus baru dan 50% penderita meninggal karenanya.¹ Kanker kolorektal merupakan keganasan yang umum di negara berkembang seperti Afrika dan Asia, tetapi insidensinya lebih rendah dibanding dengan di negara maju.² Tahun 1994-2003 di Indonesia terdapat 372 penderita kanker kolorektal yang berobat ke RSK Dharmas, sebagian besar adalah keganasan di rektum (51,6%) dan 46,56% penderita berada pada Duke's D (stadium IV TNM).³

Meskipun pembedahan dan terapi adjuvan mengalami kemajuan, lebih dari 40% penderita yang dioperasi mengalami kekambuhan selama *follow-up*.⁴ Oleh sebab itu, selain modalitas berupa kemoterapi dan radioterapi yang diberikan sesudah pembedahan, penanganan kanker kolon saat ini juga melibatkan imunoterapi,^{5,6} yang bertujuan untuk memodulasi/menyokong sistem imun sistemik agar lebih mampu memusnahkan sel kanker sehingga dapat meningkatkan kualitas hidup penderita.⁶⁻⁸ Fungsi sistem imun dalam kaitannya dengan imunitas terhadap tumor adalah fungsi protektif dengan cara mengenal dan menghancurkan sel-sel abnormal sebelum berkembang menjadi tumor atau dibunuhnya jika tumor sudah tumbuh. Peran sistem imun itu disebut *immune surveillance* yang secara teoritik memastikan terjadinya apoptosis pada sel kanker.^{7,9-11}

Limfosit sitotoksik CTL dan sel NK merupakan pemeran kunci dalam fungsi efektor respons imun yang bersama-sama melaksanakan jalur sitotoksitas yang dibutuhkan dalam melawan dan mengeliminasi sel transformasi/tumor.¹²⁻¹⁵ Salah satu jalur yang digunakan CTL dan sel NK untuk mengeliminasi sel tumor adalah dengan cara eksositosis granula, yaitu pengiriman granzym intraseluler oleh protein pembuat pori yaitu perforin. Bagaimana perforin mengirimkan granzym masih belum dipahami secara jelas. Studi tentang interaksi perforin dengan membran plasma menunjukkan kemampuannya untuk membentuk struktur menyerupai pori/lubang yang analog dengan komponen komplemen C9.^{16,17} Sejumlah studi *in vitro* telah membuktikan bahwa perforin dan atau granula sitoplasmik yang diisolasi dari limfosit sitotoksik dapat melisis berbagai sel target yang ditandai dengan adanya lesi pada pori-pori membran target. Hasil ini

$191,89 \pm 50,68$ ($p = 0,000$). Persentase rerata ekspresi perforin kelompok X sebesar $39,00 \pm 1,80\%$, lebih tinggi dibandingkan dengan K+ yakni $23,00 \pm 3,00\%$ ($p = 0,000$).

Simpulan: Ekstrak *P. niruri L* meningkatkan status imunologi melalui mekanisme peningkatan infiltrasi limfosit dan ekspresi perforin untuk melawan kanker kolon pada tikus coba.

memberikan bukti bahwa perforin adalah toksin sitolitik yang kuat, yang dibutuhkan untuk menghantarkan granzym ke dalam sitosol sel target.¹⁶⁻¹⁹

Sel CTL dan sel NK menggunakan mekanisme dasar yang sama untuk menghancurkan sel target, meskipun mereka dipicu oleh reseptor yang berbeda. Sel NK mengekspresikan aktivitas antitumornya melalui sekresi perforin dan granzym yang memecah molekul sitoplasmik pengontrol apoptosis dan produksi sitokin.²⁰⁻²² Destruksi sel-sel berpotensi ganas oleh CTL juga melalui sekresi granula sitotoksik yang antara lain berisi perforin dan granzym. Sitotoksitas yang diperantarai sel tersebut juga mengatur dan mengakhiri respons imun.^{7,13,15}

Berbagai senyawa yang dapat berfungsi sebagai imunomodulator banyak terkandung dalam tanaman obat (herbal). Salah satu herbal yang banyak dimanfaatkan masyarakat adalah *P. niruri L*, di Indonesia dikenal dengan nama meniran. *Phyllanthus niruri Linn* sering digunakan masyarakat untuk mengobati demam, sariawan, diare dan penghancur batu ginjal,²³ juga sebagai antimalaria²⁴ dan anti hepatitis B.²⁵ Herbal ini dalam pengobatan tradisional India dimanfaatkan untuk pengobatan penyakit kuning (*Jaundice*), gangguan menstruasi, penyakit kulit dan diabetes.²⁶ Uji preklinis dan klinis telah membuktikan herbal tersebut memiliki aktivitas imunostimulasi,²⁷ antitumor²⁸ dan anti karsinogenik.^{28,29}

Phyllanthus niruri Linn kaya dengan berbagai kandungan kimia, antara lain lignan (filantin, hipofilantin, nirantin, isolintetralin, nirfilin, filnirurin, hinikinin, lintetralin dan filantostatin), flavonoid (*quercetin*, *quercitrin*, *isoquercitrin*, astragilin, *rhamnopynoside*, rutin dan nirurin), alkaloid, tanin, saponin, triterpenoid, damar, steroid, kalium, vitamin C, asam lemak dan asam fenolat.^{26,30,31} Senyawa flavonoid yang terkandung dalam *P. niruri L* berkhasiat sebagai antioksidan dan antineoplastik.³² Flavonoid terbukti menghambat proliferasi dan menginduksi apoptosis pada *cell line* kanker kolon manusia Caco-2 dan HT-29³³ juga SW480.³⁴ Senyawa lignan bersifat sebagai antineoplastik.^{35,36} Timbul dugaan kuat bahwa ekstrak *P. niruri L* juga memiliki aktivitas imunostimulasi untuk melawan kanker kolon yang masih harus dibuktikan melalui uji *in vivo* pada hewan coba. Penelitian bertujuan untuk mengevaluasi perbedaan status imunologis antara tikus coba yang menderita kanker

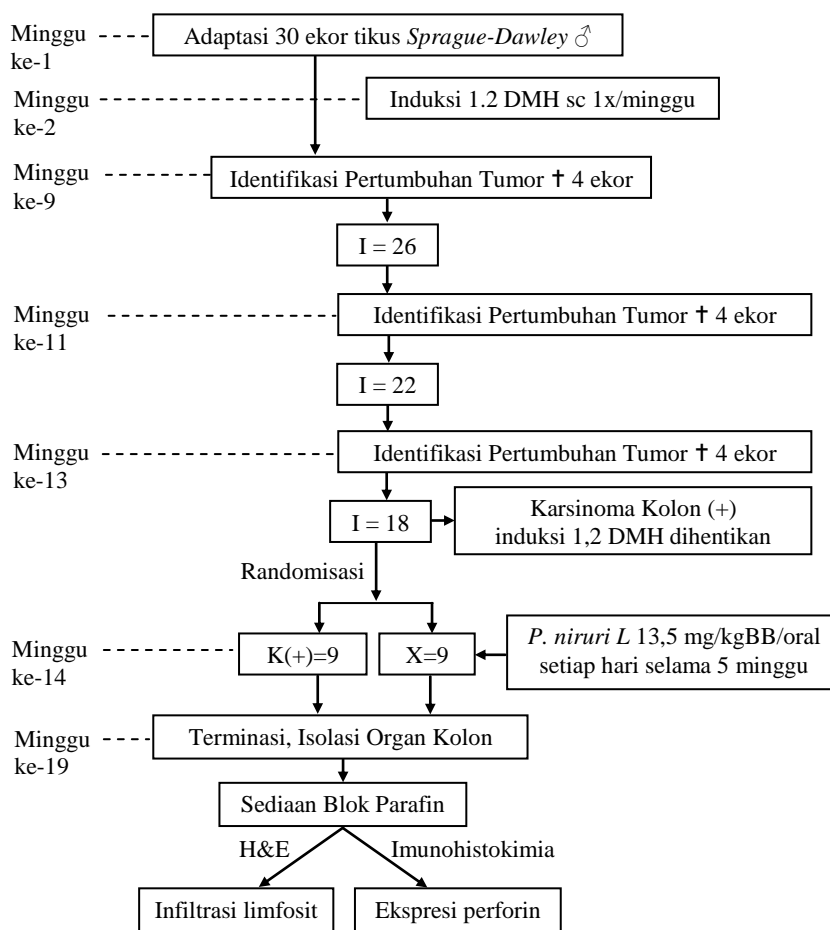
kolon yang tidak diberi dengan yang diberi ekstrak *P. niruri L*, dengan menganalisis infiltrasi limfosit dan ekspresi perforin.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan rancangan *The Randomized Posttest-Only Control Group Design*. Sampel dipilih secara random dari populasi terjangkau berupa 30 tikus galur *Sprague-Dawley* jantan yang dikembangbiakkan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Unit IV (Pre Klinik) UGM, berumur 6-7 minggu, berat badan 170-220 gram dan sehat. Sampel diinduksi 1,2 DMH 30 mg/kgBB subkutan pada hari pertama tiap minggu (prosedur ini sesuai dengan Dani *et al.*, 2007).³⁷ Pada minggu ke-9, 11 dan 13 tikus yang diinduksi dikorbankan masing-masing empat tikus per minggu untuk deteksi pertumbuhan kanker kolon. Pada minggu ke-13 keempat tikus sudah tumbuh kanker kolon, selanjutnya induksi dihentikan dan sisa 18 tikus

dirandom alokasi menjadi 2 kelompok yaitu kontrol positif (K+)=9 ekor tikus tanpa pemberian *P. niruri L* dan dan kelompok X=9 ekor tikus yang diinduksi kemudian diberi ekstrak *P. niruri L*. Minggu ke-19 seluruh tikus coba diterminasi, jaringan kolon dengan lesi tumor dieksisi dan diproses dalam blok parafin, dipotong setebal 4 mikron kemudian diberi pulasan sesuai kebutuhan. (Gambar 1).

Ekstrak yang digunakan dibuat dari seluruh bagian tanaman *P. niruri L* segar yang diekstraksi dengan metode maserasi memakai pelarut alkohol (etanol) 70%. Setelah melalui beberapa proses, etanol 70% diuapkan sehingga tersisa ekstrak berbentuk serbuk padat.³⁸ Pemberian untuk tikus harus dalam bentuk larutan. Serbuk ekstrak *P. niruri L* ditimbang sesuai kebutuhan, kemudian dilarutkan dengan aquades steril dan dicampur menggunakan *shaker* sampai larutan menjadi homogen. Ekstrak *P. niruri L* diberikan pada tikus coba dengan dosis 13,5 mg/kgBB perhari peroral melalui sonde.



Gambar 1. Skema alur penelitian

Variabel terikat yang diukur: 1). Infiltrasi limfosit adalah jumlah semua limfosit di sekitar jaringan kanker kolon yang diberi pulasan rutin hematoxilin-eosin (H&E), dihitung pada 5 lapang pandang dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x dan dihitung reratanya. Pengukuran dilakukan oleh 2 orang yaitu peneliti dan ahli patologi anatomi, dengan *clinical agreement* 95% dan 2). Ekspresi perforin adalah jumlah semua limfosit sitotoksik dalam jaringan kanker kolon yang berwarna coklat dengan pulasan antibodi monoklonal anti-perforin (ekspresi perforin positif) pada 100 sel tumor per 5 lapangan pandang dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Penghitungan dilakukan oleh 2 orang yaitu peneliti dan ahli patologi anatomi, dengan *clinical agreement* 95%.³⁹

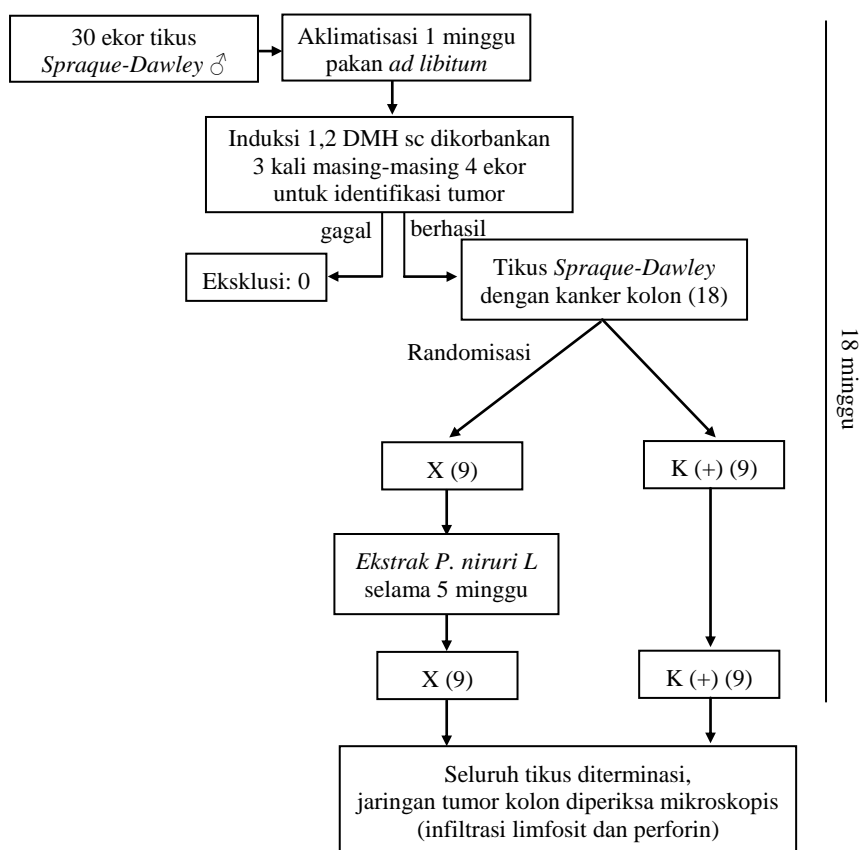
Seluruh proses pengolahan jaringan dan pembacaan hasil dilaksanakan di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UGM/RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta. Semua data menunjukkan distribusi normal sehingga analisis data meliputi analisis univariat untuk mengetahui nilai rerata masing-masing kelompok yang disajikan dalam grafik *Boxplot* dan uji t tidak berpasangan untuk melihat perbedaan akibat perlakuan

yang terjadi pada kedua kelompok. Derajat signifikansi apabila $p < 0,05$ dan interval kepercayaan 95%.

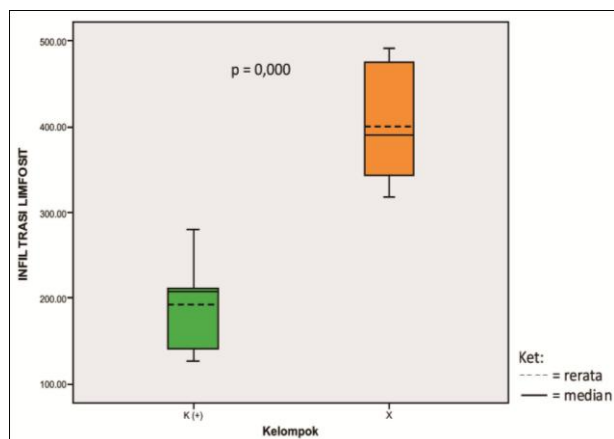
HASIL

Selama penelitian berlangsung, sejak minggu pertama masa adaptasi sampai berakhirnya perlakuan tidak ada tikus yang mati, seperti terlihat dalam Consort (*consolidated report of trial*) penelitian pada Gambar 2. Secara makroskopik dapat diamati bahwa pada minggu ke-9 mulai tumbuh tumor pada jaringan kolon tikus yang diinduksi dengan karsinogen 1,2,DMH. Empat sampel yang diterminasi pada minggu ke-12 induksi memperlihatkan gambaran adenokarsinoma kolon secara mikroskopis.

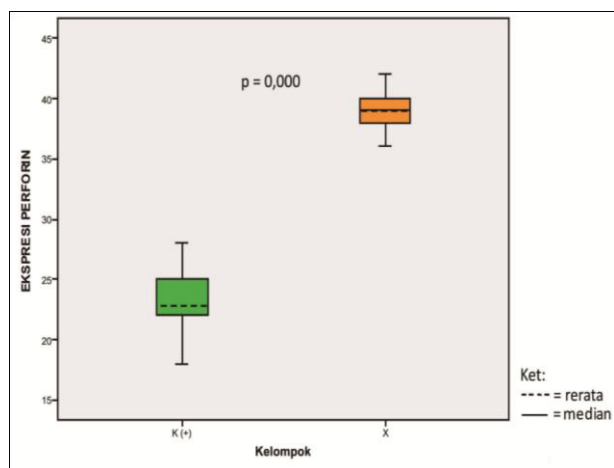
Hasil analisis univariat menunjukkan bahwa rerata jumlah infiltrasi limfosit intratumoral tikus *Sprague-Dawley* yang diinjeksi 1,2 DMH secara subkutan kemudian diterapi dengan ekstrak *P. niruri L* dosis 13,5 mg/kgBB secara oral setiap hari (X) adalah $401,89 \pm 70,19$. Jumlah ini jauh lebih tinggi dibanding jumlah yang diperoleh kelompok K(+) dimana rerata jumlah infiltrasi limfositnya hanya $191,89 \pm 50,68$. Perbedaan nilai rerata infiltrasi limfosit masing-masing kelompok lebih jelas dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 2. *Consolidated report of trial*



Gambar 3. Grafik *boxplot* infiltrasi limfosit kelompok K(+) (kontrol positif diinduksi 1,2 DMH 30 mg/kgBB) dan kelompok X (diinduksi 1,2 DMH 30 mg/kgBB kemudian diberi ekstrak *P. Niruri L* 13.5 mg/kgBB). T tes $p=0,000$.



Gambar 4. Grafik *boxplot* ekspresi perforin kelompok K(+) (kontrol positif diinduksi 1,2 DMH 30 mg/kgBB) dan kelompok X (diinduksi 1,2 DMH 30 mg/kgBB kemudian diberi ekstrak *P. Niruri L* 13.5 mg/kgBB). T tes $p=0,000$.

Hasil uji t tidak berpasangan menunjukkan bahwa rerata infiltrasi limfosit kelompok X lebih tinggi secara sangat signifikan dibanding kelompok K(+) ($p=0,000$). Hasil ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak *P. niruri L* mampu meningkatkan infiltrasi limfosit dengan sangat signifikan pada tikus coba yang menderita kanker kolon dibanding tanpa pemberian ekstrak tersebut. Ekspresi perforin merupakan salah satu parameter untuk menilai respons imun seluler antitumor khususnya yang diperantarai oleh sel limfosit T sitotoksik (CTL) dan sel NK dalam usaha mengeliminasi sel ganas seperti pada kanker kolon. Hasil analisis univariat terhadap ekspresi perforin dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 4. Nilai persentase rerata ekspresi perforin menunjukkan grafik perbedaan yang sangat signifikan antara

kelompok K(+) dan X. Berdasarkan Gambar 4 dapat dijelaskan bahwa pada kelompok K(+) diperoleh persentase rerata ekspresi perforin $23,00 \pm 2,96\%$, sementara persentase rerata ekspresi perforin kelompok perlakuan X lebih tinggi ($39,00 \pm 1,80\%$). Hasil uji t tidak berpasangan menunjukkan bahwa persentase rerata ekspresi perforin kelompok X lebih tinggi secara sangat signifikan dibanding kelompok K(+) ($p=0,000$).

Pemberian ekstrak *P. niruri L* pada kelompok perlakuan setelah kanker tumbuh memberikan efek peningkatan ekspresi perforin secara sangat bermakna.

PEMBAHASAN

Rancangan yang dipilih dalam penelitian eksperimental murni ini cukup adekuat karena dilakukan randomisasi dalam pengelompokan subyek, sehingga faktor yang mengancam validitas dapat dikendalikan. Berdasarkan *consort* penelitian ini terlihat bahwa tidak ada tikus coba yang mati sehingga dapat mengikuti penelitian sejak awal sampai akhir. Respons yang terjadi pada variabel terikat dianggap sama pada setiap individu tikus karena subyek penelitian berasal dari tikus *Sprague-Dawley* galur *inbred* yang sama, berat badan yang relatif stabil, umur dan jenis kelamin yang sama, cara pemeliharaan dan perlakuan serta pengamatan mikroskop yang sama. Keadaan yang berbeda dari masing-masing kelompok terjadi oleh karena pemberian perlakuan yang berbeda. 1,2 *dimethylhidrazine* (DMH) adalah senyawa berbentuk cairan tak berwarna, mudah larut dan baunya mirip amoniak. 1,2 DMH merupakan karsinogen poten yang dilaporkan menginduksi kanker kolon pada sejumlah spesies hewan eksperimen, seperti pada mencit, tikus dan rodent. Meskipun demikian, mekanisme kerjanya masih belum jelas. Kanker pada kolon mencit atau tikus yang diinduksi 1,2 DMH memperlihatkan stadium prekanker yang jelas. Rangkaian perubahan histopatologik pada kolon tergantung dosis dan lama pemberian, dapat diamati sebelum timbul karsinoma.^{40,41}

Imunogenitas tumor sangat tergantung pada bagaimana tumor itu terbentuk. Tumor yang terbentuk akibat karsinogen pada umumnya imunogenik. Spesifikasi dan sifat imunogenitasnya juga bergantung pada potensi karsinogen dengan sel target. Namun sebelum respons imun antitumor yang efektif terbentuk, maka pertumbuhan tumor akan menghasilkan tumor yang resisten terhadap mekanisme respons imun. Sebagian besar sel efektor yang berperan dalam mekanisme anti tumor adalah limfosit sitotoksik sel T (CTL) $CD8^+$ dan sel NK. Oleh karenanya timbul dugaan bahwa sel-sel limfosit sitotoksik tersebut berperan dalam fungsi *surveillance* dengan mengenal dan menghancurkan sel-

sel yang mengandung gen mutan yang dapat menyebabkan atau berhubungan dengan pertumbuhan tumor ganas.^{6,13,42}

Kehadiran limfosit menjadi prediktor yang menguntungkan untuk meramalkan respons terapi beberapa jenis tumor, termasuk kanker kolorektal. Intensitas infiltrat limfositik tumor merefleksikan intensitas respons spesifik terhadap tumor. Dengan demikian infiltrasi limfosit intratumoral dan di sekitar sel kanker dapat digunakan sebagai marker respons imun terhadap kanker.⁴²⁻⁴⁴ Karakteristik morfologi limfosit dan identifikasi keberadaannya di dalam dan di sekitar sel kanker dapat dievaluasi pada potongan jaringan histologik dengan pewarnaan rutin.⁴⁵ Penelitian ini menemukan bahwa jumlah infiltrasi limfosit pada tikus coba yang mendapat ekstrak *P. niruri L* jauh lebih tinggi secara sangat signifikan dibanding tikus coba tanpa pemberian ekstrak tersebut. Hal ini mengindikasikan bahwa *P. niruri L* dapat memodulasi respons imun antitumor terhadap kanker kolon, sehingga diharapkan respons terapi pada hewan coba akan lebih baik. Hasil penelitian ini mendukung teori sebelumnya, bahwa infiltrasi limfosit dapat digunakan sebagai prediktor respons terapi.

Korelasi yang kuat antara peningkatan jumlah infiltrasi limfosit tumor dengan perbaikan prognosis telah dibuktikan oleh beberapa peneliti sebelumnya. Limfosit CD8⁺ yang menginfiltrasi jaringan tumor menjadi kandidat yang menjanjikan dalam menentukan faktor prediktif dan prognostik, khususnya jika dikombinasikan dengan status genetik mikrosatelit pada penderita kanker kolorektal. Pada pasien kanker kolorektal, adanya sel T CD8⁺ intraepitelial di dalam sarang kanker memiliki dampak yang lebih relevan terhadap *survival* dan signifikansi prognostik dibandingkan sel T di lokasi lain.⁴⁶ Penderita kanker kolorektal yang mendapat *Famotidine* pra-operatif mengalami kenaikan infiltrasi limfosit intratumoral yang signifikan dibanding kelompok kontrol plasebo dan hasil ini berhubungan erat dengan berkurangnya kekambuhan dan peningkatan *survival* yang lebih lama.⁴⁷ Infiltrasi limfosit dan perforasi memiliki nilai prediktif untuk respons positif terhadap kemoterapi 5-fluorouracil (5-FU) pada pasien kanker kolorektal stadium III. Pasien-pasien dengan kepadatan tinggi sel CD8⁺ menunjukkan *survival* yang sangat baik jika diobati dengan 5-FU dibandingkan dengan pasien yang kepadatan sel CD8⁺nya rendah.⁴⁸

Infiltrat imunologik karakteristik di dalam jaringan tumor merupakan prediktor yang lebih baik bagi *survival* pasien dibanding dengan metode histopatologik yang digunakan untuk stadium kanker kolorektal.^{8,45} Adanya reaktivitas fungsional infiltrasi sel T melawan antigen tumor pada pasien kanker kolorektal, juga

memperlihatkan migrasi sel Th CD4⁺ yang selektif terhadap tumor dan aktivitas sitotoksik CD8⁺ yang spesifik terhadap tumor pada pasien-pasien tersebut.⁴⁹ Infiltrasi limfosit berpartisipasi dalam mengontrol pertumbuhan tumor, tidak hanya melalui sitotoksitas sel T tetapi juga dengan memproduksi mediator larut, seperti sitokin yang bekerja sebagai imunomodulator, baik sebagai stimulator ataupun inhibitor pertumbuhan.⁵⁰ *P. niruri L* juga bekerja sebagai imunomodulator yang membangkitkan respons imun yang pada gilirannya dapat menghambat perkembangan kanker kolon pada hewan coba.^{27,51}

Pengenalan kemampuan sistem imun untuk mempertahankan tubuh dari serangan penyakit sebagai pendekatan baru dalam terapi kanker dikenal dengan imunoterapi. Tujuan imunoterapi kanker adalah memodulasi/menyokong sistem imun agar lebih mampu untuk memusnahkan sel kanker. Identifikasi antigen berhubungan dengan tumor yang dikenali oleh efektor seluler dan humoral sistem imun mempunyai perspektif yang menjanjikan sebagai imunoterapi kanker.^{6-8,11} Imunoterapi untuk kanker kolorektal saat ini berkembang pesat, tetapi pada manusia sebagian besar masih bersifat eksperimental. Berbagai pendekatan ditujukan pada komponen-komponen sistem imun yang berbeda, sebagian besar menggunakan produk biologik alamiah yang dapat mengaktifasi sistem imun melalui rekayasa genetika dan teknik hibridoma. Imunoterapi menggunakan antibodi monoklonal, vaksin, sitokin dan limfokin rekombinan (terutama IL-2 dan IFN), limfosit T serta sel dendritik sedang dieksplorasi secara intensif.^{10,13,15,51}

Aktivitas imunomodulasi pada tingkat seluler dan molekuler diduga diinisiasi oleh komponen bioaktif yang terkandung didalam *P. niruri L*, misalnya golongan polifenol flavonoid, tannin dan triterpenoid yang berperan dalam respons inflamasi. Inflamasi melibatkan berbagai komponen seluler dan molekuler yang dikenal sebagai mediator inflamasi. Limfosit T dibutuhkan dalam reaksi inflamasi, perkembangan kanker dan imunitas antikanker.^{52,53} Flavonoid terbukti memiliki aktivitas imunomodulasi. Flavonoid quercetin dan rutin meningkatkan aktivasi limfosit dan sekresi interferon- γ (IFN- γ), sehingga aktivasi sel T CD8⁺ meningkat.^{54,55} Triterpenoid yang berasal dari tumbuhan dapat menginduksi antiinflamasi, sitoprotektif dan apoptosis, juga sebagai antiproliferasi.^{56,57}

Hasil penelitian ini juga berhasil membuktikan bahwa ekspresi perforin pada tikus coba yang mendapat ekstrak *P. niruri L* lebih tinggi dan berbeda secara sangat signifikan dibanding tikus coba yang tidak mendapat ekstrak tersebut. Hasil ini membuktikan bahwa *P. niruri L* memiliki efek meningkatkan ekspresi

perforin yang disekresikan oleh CTL dan sel NK. Perforin ini sangat dibutuhkan oleh sel-sel imunokompeten dalam kaitan dengan respons imun antitumor untuk memastikan terjadinya apoptosis sel kanker. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa *P. niruri* L meningkatkan status imunologis atau bersifat sebagai imunostimulator yang meningkatkan kerja CTL dan sel NK, sehingga respons imun seluler antitumor meningkat untuk mengeliminasi keganasan kolon pada hewan coba.

Kemampuan limfosit sitotoksik untuk menginisiasi apoptosis pada sel-sel yang mengalami transformasi dan membunuh target selulernya bergantung pada dua strategi transduksi sinyal yang pada dasarnya berbeda dan membutuhkan kontak antara efektor dan sel target.^{16,51} Saat pengenalan sel T kepada targetnya melalui reseptor antigennya yaitu TCR (*T cell receptor*) akan terbentuk *immunological synapse*, suatu cincin protein yang terbentuk karena adanya interaksi antara integrin $\alpha\beta 2$ *lymphocyte function-associated antigen-1* (LFA-1) dengan *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1). *Immunological synapse* yang dibentuk terorganisasi dengan rapi dan terbagi dalam 2 domain, yaitu *signaling domain* tempat terjadinya kontak antara Fas ligan dengan reseptor Fas/CD95 dan *secretory domain*, tempat di mana granula sitotoksik mengadakan fusi untuk mengantarkan isinya yang bersifat sitolitik ke dalam sel target.^{15,17} *Immunological synapse* terbentuk beberapa menit setelah TCR (CD3) berinteraksi dan mengenali antigennya yang dipresentasikan oleh *major histocompatibility complex-1* (MHC-1) dan berakhir lebih dari satu jam sampai kompleks TCR diinternalisasi dan dihancurkan. Pembentukan sinaps sangat bergantung pada aktivasi GTPase, Ras/MAPK, *microtubule-organizing center* (MTOC) dan sitoskeleton aktin yang menggerakkan molekul ke dalam dan keluar sinaps.^{7,15,16}

Mekanisme apoptosis sel target/sel kanker oleh sel NK dan CTL melalui dua jalur sinyal transduksi. Jalur pertama, sel-sel efektor mengekspresikan ligan famili TNF seperti Fas/CD95 pada permukaan selnya dan digunakan sebagai senjata untuk membunuh sel target atau memusnahkan sel yang mengalami transformasi yang mengekspresikan reseptor Fas yang sesuai. Fas-ligan (FasL) penting dalam proses eradikasi tumor yang dimediasi CTL, sementara TRAIL (*tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) atau Apo2-ligan penting bagi eliminasi tumor yang dimediasi sel NK.^{22,51,58}

Apoptosis yang diinduksi *granzym* yang dimediasi perforin merupakan jalur lain sistem imun untuk mengeliminasi sel-sel transformasi/sel tumor yang dilaksanakan oleh limfosit sitotoksik efektor CTL dan

sel NK,^{17,19,59} melalui sekresi isi granula sitotoksik (sitotoksitas eksositosis) yang bersifat merusak ke dalam sel target sehingga mempromosi kematian sel dengan cara memecahkan/hidrolisis substrat protein spesifik termasuk caspase.^{17-19,51} Sel CTL harus melakukan kontak yang dekat sekali dengan sel kanker sampai kedua membran saling berhimpit sehingga terjadi sekresi isi granula sitotoksik. Granula sitotoksik berupa kompleks makromolekul yang terdiri dari *granzym* dan perforin yang terikat dengan *serglycin* (matriks proteoglikan) dan *calreticulin* (suatu inhibitor perforin) akan masuk ke dalam *immunological synapse* yang terbentuk antara sel efektor dan targetnya. Setelah eksositosis ke dalam celah antara target dan sel efektor, perforin terurai dari kompleks granula dan berpolimerisasi sehingga dapat bekerja secara terpisah untuk mengantarkan kompleks *granzym-serglycin* ke dalam sel target dengan cara endositosis.^{17,19,60}

SIMPULAN

Sesuai analisis hasil penelitian dan pembahasan, maka disimpulkan bahwa ekstrak *P. niruri* L meningkatkan status imunologis melalui mekanisme peningkatan infiltrasi limfosit dan ekspresi perforin untuk melawan kanker kolon pada tikus *Sprague-Dawley* yang diinduksi 1,2 DMH.

Ucapan terima kasih

Terima kasih yang tak terhingga disampaikan kepada (1) Direktorat Penelitian dan Pelayanan Masyarakat Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia dan (2) PT Dexa Medica atas bantuan dana yang telah diberikan sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik dan lancar, (3) dr. Awal Prasetyo, M.Kes, Sp.THT-KL atas bantuan pengadaan karsinogen 1,2 DMH.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J and Murray T. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2008 [Disitasi 10 Agu 2011];58:71-96. Tersedia pada: PUBMED.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18287387>
2. Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR and Buchler MW. Colorectal Cancer. *Lancet* [Internet]. 2005 [Disitasi 8 Sep 2010];365:153-65. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014067360517706X>
3. Kastomo DR dan Soemardi A. Tindakan bedah pada keganasan kolorektal stadium lanjut. *Maj. Kedokt. Indon* 2005;55(7):498-502.
4. Price T, Pittman K, Patterson W, Colbeck M, Rieger N, Hewett P, et. al. Management and survival trends in advanced colorectal cancer. *Clinical Oncology* [Internet]. 2008 [Disitasi 7 Jun 2011];20(8):626-30. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0936655508002446>

5. National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines: Colon cancer v.1. [Internet] 2010 [Disitasi 14 Mei 2011] Tersedia pada: <http://www.nccn.org/professionals/physiangls/PDF/colon.pdf>
6. Chen X, Hu ZP, Yang XX, Huang M, Gao Y, Tang W, *et al.* Monitoring of immune responses to a herbal immunomodulator in patients with advanced colorectal cancer. *International Immunopharmacology* [Internet]. 2006 [Disitasi 6 Jun 2011];6:499-508. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576905002535>
7. Adam JK, Odhav B and Bhoola KD. Immune responses in cancer. *Pharmacology and Therapeutics* [Internet]. 2003 [Disitasi 8 Sep 2010];99:113-32. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725803000561>
8. Rescigno M, Avogadri F and Curigliano G. Challenges and prospects of immunotherapy as cancer treatment. *Biochemical et Biophysical Acta* [Internet]. 2007 [Disitasi 6 Jun 2011];1776:108-23. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304419X07000236>
9. Kresno SB. Aspek imunologik tumor. Dalam: *Imunologi diagnosis dan prosedur laboratorium*. Edisi Keempat, Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran UI. 2001;208-29.
10. Jakobisiak M, Lasek W and Golab J. Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunology Letters* [Internet]. 2003 [Disitasi 6 Jun 2011];90:103-22. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165247803001949>
11. Finn OJ. Cancer immunology. *The New England Journal of Medicine* [Internet]. 2008 [Disitasi 8 Sep 2010]; 358 (25); 2704-15. Tersedia pada: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra072739>
12. Bremers AJA and Parmiani G. Immunology and immunotherapy of human cancer: present concepts and clinical developments. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* [Internet]. 2000 [Disitasi 6 Jun 2011]; 34; 1-25. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1040842899000591>
13. Dalerba P, Maccali D, Casati C, Castely C and Parmiani G. Immunology and immunotherapy of colorectal cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* [Internet]. 2003 [Disitasi 6 Jun 2011]; 46; 33-57. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1040842802001592>
14. Zbar AP. The Immunology of colorectal cancer. *Surgical Oncology* [Internet]. 2004 [Disitasi 8 Sep 2010]; 13; 45-53. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960740404000519>
15. Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S. *Immunity to Tumors*. In: *Cellular and Molecular Immunology*. 6th ed., Philadelphia: Saunders. 2010;397-418.
16. Trapani JA and Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Natural Reviews* [Internet]. 2002 [Disitasi 20 Apr 2011]; 2;736-47. Tersedia pada: <http://www.columbia.edu/itc/hs/medical/pathophys/immunology/readings/FuncSigGranzymeCellDeath.pdf>
17. Lieberman J. The ABCS of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature reviews* [Internet]. 2003 [Disitasi 20 Apr 2011]; 3; 361-70. Tersedia pada: <http://www.mastgrp.com/Sanquin/References/gran%20med%20cytotox.pdf>
18. Metkar SS, Wang B, Santelises MA, Raja SM, Hansen LU, Podack E *et al.* Cytotoxic cel granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity* [Internet]. 2002 [Disitasi 20 Apr 2011]; 16; 417-28. Tersedai pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761302002868>
19. Bolitho P, Voskobonik I, Trapani JA and Smyth MJ. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Current Opinion In Immunology* [Internet]. 2007 [Disitasi 20 Apr 2011]; 19; 339-47. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0952791507000593>
20. Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, Goldfarb RH, Nagelkerke JF, Nannmark U, *et al.* NK cells and the tumour microenvironment: implication for NK-cell function and anti-tumour activity. *Trends in Immunology* [Internet]. 2003 [Disitasi 8 Sep 2010]; 24 (11); 603-9. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471490603002989>
21. Anderson SK. Biology of Natural Killer cells: What is the relationship between Natural Killer cell and cancer? Will an increased number and/or function of Natural Killer cells result in lower cancer incidence? *J. Nutrition* [Internet]. 2005 [Disitasi 8 Sep 2010]; 135 (12): 2910S-15S. Tersedia pada: <http://jn.nutrition.org/content/135/12/2910S.full.pdf+html>
22. Screpanti V, Wallin RPA, Grandien A and Ljunggren HG. Impact of FASL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells. *Molecular Immunology* [Internet]. 2005 [Disitasi 6 Jun 2011]; 42; 495-9. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589004003086>
23. Sulaksana J dan Jayusman DI. *Meniran, budi daya dan pemanfaatan untuk obat*. Cetakan I, Jakarta: Penebar Swadaya, 2004.
24. Mustofa E, Sholikha N and Wahyono S. In vitro and in vivo antiplasmodial activity and cytotoxicity of extracts of *Phyllanthus niruri* Linn herbs traditionally used to treat malaria in Indonesia. *Southeast Asian J. Trop Med Public Health* [Internet]. 2007 [Disitasi 9 Agu 2011]; 38 (4); 609-15. Tersedia pada: http://www.tm.mahidol.ac.th/seameo/2007_384/01-3985.pdf
25. Liu L and Lin H. Genus *Phyllanthus* for chronic hepatitis B virus infection: a systematic review. *J Viral Hepatitis*. [Internet]. 2001 [Disitasi 9 Agu 2011]; 8; 358-66. Tersedia pada: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2893.2001.00307.x/ftd>
26. Taylor L. *Technical data report for Chanca Piedra*. In: *Herbal Secrets of The Rainforest* 2nd ed. Austin India: Sage Press Inc. [Internet]. 2003 [Disitasi 9 Agu 2011].

- Tersedia pada: <http://www.rain-tree.com/chanca-techreport.pdf>.
27. Ma'at S. Imunomodulator manfaat dan bahayanya. Dalam: Kusmita L, dan Djatmika. Imunomodulator dan Perkembangannya. Prosiding Seminar Nasional Farmasi Tahun 2010 Cetakan ketiga. Semarang: Penerbit STIFAR Yayasan Farmasi, 2010;14-43.
 28. Rajeshkumar NV, Joy KL, Kuttan G, Ramsewak RS, Nair MG and Kuttan R. Antitumour and anti-carcinogenic activity of *Phyllanthus amarus* extract. *Journal Ethnopharmacology* [Internet]. 2002 [Disitasi 16 Jun 2011];81(1);17-22. Tersedia pada: Sciencedirect. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874101004196>
 29. Rajeshkumar NV and Kuttan R. *Phyllanthus amarus* extract administration increases the life span of rats with hepatocellular carcinoma. *Journal of Ethnopharmacology* [Internet]. 2000 [Disitasi 9 Agu 2011]: 73; 215-9. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874100003111>
 30. Bagalkotkar G, Sagineedu SR, Saad MS and Stanslas J. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn and their pharmacological properties: A review. *J. Pharma and Pharmacol* [Internet]. 2006 [Disitasi 9 Agu 2011]: 58; 1559-70. Tersedia pada: PUBMED. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17331318>
 31. Markom M, Hasan M, Daud WRW, Singh H and Jahim JM. Extraction of hydrosable tannins from *Phyllanthus niruri* Lin.: effects of solvents and extraction methods. *Separation and Purification Technology* [Internet]. 2007 [Disitasi 7 Jun 2011]: 52; 487-96. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586606001961>
 32. Lakhanpal P, and Rai DK. Quercetin: a versatile flavonoid. *Internet Journal of Medical Update* [Internet]. 2007 [Disitasi 9 Agu 2011]: 2 (2). Tersedia pada: http://www.akspublication.com/Paper05_Jul-Dec2007_.pdf
 33. Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr* [Internet]. 1999 [Disitasi 9 Agu 2011]: 38;133-42. Tersedia pada: <http://www.springerlink.com/content/b91b14ua1nhcctdc/>
 34. Murthy KNC, Kim J, Vikram A, Patil BS. Differential inhibition of human colon cancer cells by structurally similar flavonoids of citrus. *Food Chemistry* [Internet]. 2012 [Disitasi 15 Sep 2011]: 132; 27-34. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611014476>
 35. Giridharan P, Somasundaram ST, Perumal K, Vishwakarma RA, Karthikeyen NP, Velmurugan R, *et al*. Novel substituted methylenedioxy lignan suppresses proliferation of cancer cells by inhibiting telomerase and activation of *c-myc* and caspases leading to apoptosis. *British Journal of Cancer* [Internet]. 2002 [Disitasi 16 Jun 2011]: 87; 98-105. Tersedia pada: PUBMED. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12085264>.
 36. Wei W, Gong XXG, Ishrud O and Pan YJ. New lignan isolated from *Phyllanthus niruri* Linn. Structure elucidation by NMR spectroscopy. *Bull.Korean Chem.Soc* [Internet]. 2002 [Disitasi 16 Jun 2011]: 23 (6); 896-8. Tersedia pada: <http://210.36.16.53:8018/publication.asp?id=16312>
 37. Dani V, Goel A, Vaiphei K and Dhawa DK. Chemopreventive potential of zinc in experimentally induced colon carcinogenesis. *Toxicology Letters* [Internet]. 2007 [Disitasi 8 Jun 2011]: 171; 10-8. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427407000616>
 38. Handa SS, Khanuja SPS, Longo G and Rakesh DD. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. Trieste; International Centre for Science and High Technology [Internet]. 2008 [Disitasi 16 Jun 2011]. Tersedia pada: https://unido.org/fileadmin/usermedia/Publications/Pub_free/Extraction_technologies_for_medicinal_and_aromatic_plants.pdf#page=59
 39. Budijitno S, Issakh B, Handojo D, Pudjonarko D dan Riwanto I. Pengaruh ekstrak mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap skor ekspresi perforin CTL dan sel-NK serta indeks apoptosis pada adenokarsinoma mamma mencit C3H. *Media Medika Indonesiana* 2007; 42(1);13-20.
 40. Tanaka T. Colorectal carcinogenesis: review of human and experimental animal studies. *Journal of Carcinogenesis* [Internet]. 2009 [Disitasi 7 Jun 2011]: 8 (5);1-19. Tersedia pada: Sciencedirect. <http://www.carcinogenesis.com/article.asp?issn=1477-3163;year=2009;volume=8;issue=1;spage=5;epage=5;aulast=Tanaka>
 41. Yang SY, Sales KM, Fuller B, Seifalian AM and Winslet MC. Apoptosis and colorectal cancer: implications for therapy. *Trends in Molecular Medicine* [Internet]. 2009 [Disitasi 10 Sep 2011]: 15 (5); 225-33. Tersedia pada: Sciencedirect. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471491409000604>
 42. Prestwich RJ, Errington F, Hatfield P, Merrick AE, Ilett EJ, Selby PJ, *et al*. The immune system, is it relevant to cancer development, progression and treatment? *Clinical Oncology* [Internet]. 2008 [Disitasi 6 Jun 2011]: 20; 101-12. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0936655507008667>
 43. Ohtani H. Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human colorectal cancer. *Cancer Immunity* [Internet]. 2007 [Disitasi 6 Jun 2011]: 7 (4); 1-9. Tersedia pada: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2935759/>
 44. Gross S and Walden P. Immunosuppressive mechanism in human tumors: why we still cannot cure cancer. *Immunology Letters* [Internet]. 2008. [Disitasi 6 Jun 2011]: 116; 7-14. Tersedia Pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165247807002957>
 45. Simonson WN and Allison KH. Tumour-infiltrating lymphocytes for the diagnostic pathologist. *Diagnostic Histopathology* [Internet]. 2010 [Disitasi 20 Apr 2011]:

- 17 (2); 80-90. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756231710001854>
46. Prall F, Duhrkop T, Weirich V, Ostwald C, Lenz P, Nizze H, *et al.* Prognostic role of CD⁸⁺ tumor-infiltrating lymphocytes in stage III colorectal cancer with and without microsatellite instability. *Human Pathology* [Internet]. 2004 [Disitasi 20 Apr 2011]: 35 (7); 808-16. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0046817704000760>
 47. Kapoor S, Pal S, Sahni P, Gupta SD and Chattopadhyay TK. Effect of pre-operative short course famotidine on tumor infiltrating lymphocytes in colorectal cancer: a double blind, placebo controlled, prospective randomized study. *Journal of Surgical Research* [Internet]. 2005 [Disitasi 20 Apr 2011]: 129; 172-5. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022480405001058>
 48. Morris M, Platell C and Lacopetta B. Tumor-infiltrating lymphocytes perforation in colon cancer predict positive response to 5-fluorouracil chemotherapy. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2008 [Disitasi 6 Jun 2011]:14(4);1413-7. Tersedia pada: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/14/5/1413.full.pdf+html>
 49. Koch M, Beckhove P, Winkel JOD, Autenrieth D, Wagner P, Nummer D, *et al.* Tumor infiltrating T lymphocytes in colorectal cancer. *Annals of Surgery* [Internet]. 2006 [Disitasi 20 Apr 2011]: 244 (6); 986-93. Tersedia pada: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1856622/>
 50. Drescher KM and Lynch HT. Tumor infiltrating lymphocytes (TILs): lessons learned in 30 years of study. *Clinical and Applied Immunology Reviews* [Internet]. 2005 [Disitasi 6 Jun 2011]:5;149-66. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1529104905000309>
 51. Yip D, Strickland AH, Karapetis CS, Hawkins CA and Harper PG. Immunomodulation therapy in colorectal carcinoma. *Cancer Treatment Reviews* [Internet]. 2000 [Disitasi 16 Jun 2011]: 26;169-90. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305737299901603>
 52. Terzic J, Grivennikov S, Karin E and Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* [Internet]. 2010 [Disitasi 14 Mei 2011]: 138;2101-14. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508510001769>
 53. Issa AY, Volate SR and Wargovich MJ. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. *Journal of Food Composition and Analysis* [Internet]. 2006 [Disitasi 6 Jun 2011]:19;405-19. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157506000196>
 54. Cherng JM, Chiang W and Chiang LC. Immunomodulatory activities of common vegetables and spices of *umbelliferae* and its related coumarins and flavonoids. *Food chemistry* [Internet]. 2008 [Disitasi 14 Mei 2011]:106;944-50. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814607006851>
 55. Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutrition Research* [Internet]. 2004 [Disitasi 14 Mei 2011]: 24; 851-74. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0271531704001344>
 56. Ramasamy S, Wahab NA, Abidin NZ and Manickam S. Cytotoxicity evaluation of five selected Malaysian *Phyllanthaceae* species on various human cancer cell lines. *Journal of Medicinal Plants Research* [Internet]. 2011 [Disitasi 9 Agu 2011]: 5(11); 2267-73. <http://academicjournals.org/JMPR/PDF/pdf2011/4June/Ramasamy%20et%20al.pdf>
 57. Cragg GM and Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* [Internet]. 2005 [Disitasi 9 Agu 2011]: 100;72-9. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874105003259>
 58. Grimm M, Kim M, Rosenwald A, Rahden BV, Tsaui I, Meier E, *et al.* Tumour-mediated TRAIL-receptor expression indicates effective apoptotic depletion of infiltrating CD8⁺ immune cells in clinical colorectal cancer. *European Journal of Cancer* [Internet]. 2010 [Disitasi 20 Apr 2011]: 46 (12); 2314-23. Tersedia pada <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521661610002858>
 59. Afonina IS, Culien SP and Martin AJ. Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B. *Immunological Reviews* [Internet]. 2010 [Disitasi 20 Apr 2011]: 235; 105-16. Tersedia pada: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.01052896.2010.00908.x/abstract;jsessionid=82F6AC8E076762049E18DF1C8428087B.d01t03?userIsAuthenticated=false&deniedAccessCustomisedMessage=>
 60. Catalfamo M and Henkart PA. Perforin and the granule exocytosis pathway. *Current Opinion In Immunology* [Internet]. 2003 [Disitasi 20 Apr 2011]: 15; 522-27. Tersedia pada: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0952791503001146>