

## Peran Elektro-Akupuntur terhadap Perbedaan Kadar IL-2 pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar yang Diinduksi DMBA

Aliyah Adek Rahmah\*, Achdiat Agoes\*\*, Laily Yuliatun\*

### ABSTRAK

Kanker payudara adalah salah satu tumor yang bersifat ganas dan penyebab kematian utama pada wanita. Pada penderita kanker payudara, terjadi penurunan kadar interleukin-2 (IL-2) yang berfungsi sebagai antikanker. Terapi elektro-akupuntur (EA) adalah salah satu terapi komplementer yang dapat meningkatkan kadar interleukin-2 pada tubuh. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peran elektro-akupuntur terhadap perbedaan kadar interleukin-2 pada tikus yang diinduksi DMBA. Metode penelitian yang digunakan adalah *true experimental in vivo*, dengan sampel tikus Wistar berjumlah 25 ekor. Sampel dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu (i) kontrol negatif (normal), (ii) kontrol positif (DMBA), (iii) perlakuan I (DMBA dan terapi EA selama 3 hari); (iv) perlakuan II (DMBA dan terapi EA selama 5 hari); (v) perlakuan III (DMBA dan terapi EA selama 10 hari). Kadar IL-2 diukur menggunakan metode ELISA *sandwich* dan datanya dianalisis dengan *one way* ANOVA. Hasil penelitian menunjukkan rata-rata kadar IL-2 terendah terdapat pada tikus kontrol positif dan rata-rata kadar IL-2 tertinggi pada tikus perlakuan EA 10 hari. Analisis statistik uji LSD menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna diantara kelompok perlakuan terhadap rata-rata kadar IL-2 ( $p = 0.000$ ). Kesimpulan yang diperoleh yaitu terapi elektro-akupuntur dapat meningkatkan kadar IL-2 pada tikus yang diinduksi DMBA.

Kata kunci : DMBA, Interleukin-2, Kanker Payudara, Terapi elektro-akupuntur.

## The Role of Electro-Acupuncture on the Level of IL-2 in Rats (*Rattus norvegicus*) Induced by DMBA

### ABSTRACT

Breast cancer is the first leading cause of death in women. Breast cancer can decrease interleukin-2 that plays as anticancer. Electro-acupuncture (EA) is a complement therapy that can increase the level of interleukin-2 (IL-2) in the body. This research was to find out the role of electro-acupuncture therapy on the level of interleukin-2 in rat that induced by DMBA. This research was used true experimental in vivo, with twenty five female rats that were randomly assigned in 5 groups: (i) negative control (normal); (ii) positive control (DMBA); (iii) treatment group I (DMBA and EA therapy in 3 days); (iv) treatment group II (DMBA and EA therapy in 5 days); (v) treatment group III (DMBA and EA therapy in 10 days). The level of interleukin-2 were examined by sandwich ELISA and the data were analyzed by one way ANOVA. The result showed the lowest level of IL-2 were found in positive control group and the highest level of IL-2 were found in group III (DMBA and EA therapy in 10 days). LSD test showed that there were significant difference among groups on IL-2 average level ( $p = 0.000$ ). It can be concluded that electro-acupuncture therapy can increase the level of interleukin-2 in rats that was induced by DMBA.

Keyword: Breast cancer; DMBA, Electro-acupuncture therapy, Interleukin-2.

\* Program Studi Ilmu Keperawatan, FKUB

\*\* Program Studi Pendidikan Dokter, FKUB

## PENDAHULUAN

Kanker payudara adalah tumor ganas yang menyerang jaringan payudara. Kanker ini merupakan penyebab kematian utama pada wanita yang berusia antara 45 sampai 64 tahun. Kanker payudara ini dapat di temukan secara *in situ* (lokal), ataupun tak jarang juga ditemukan dalam keadaan sebagai neoplasma maligna (telah menyebar).<sup>1,2</sup> Globocan (*Global Burden of Cancer*) pada tahun 2008 dari *International Agency for Research on Cancer* (IARC) menyatakan insiden kanker payudara di Indonesia 36,2/100.000 perempuan dan angka kematian mencapai 18,6/100.000 perempuan.<sup>3</sup>

Adanya pendeteksian tubuh terhadap sel kanker akan mengaktivasi sel T helper yang akan memproduksi sitokin dan kemokin yang akan mengaktifkan sel *natural killer* (NK) dan sel sitotoksik yang akan melawan kanker. Namun, apabila sel kanker dapat menghindari deteksi dan tumbuh, sel-sel kanker akan mengeluarkan zat-zat yang menciptakan dominasi terhadap Th-2, dan membuat tubuh kurang mampu melawan sel kanker.<sup>2</sup>

Elektro-akupunktur adalah salah satu jenis akupunktur yang dalam prosedur pelaksanaannya telah dimodifikasi dengan melibatkan titik akupunktur yang dirangsang dengan arus listrik. EA memiliki efek tertentu pada suhu bipotensial dan kulit. Pemberian stimulasi pada titik ST 36 bertujuan untuk meningkatkan interleukin-2 yang berfungsi dalam merangsang sel-T sitotoksik untuk menyerang dan membunuh sel kanker atau sel yang terinfeksi virus. Selain itu interleukin-2 juga berfungsi dalam membangkitkan makrofag untuk meningkatkan fagositosis.<sup>2</sup>

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan peran elektro-akupunktur terhadap perbedaan kadar IL-2 pada tikus

(*Rattus norvegicus*) galur Wistar yang telah diinduksi DMBA. Adanya stimulasi akupunktur dengan aliran listrik diduga dapat meningkatkan stimulasi IL-2 terhadap sel fagosit dan sel T sitotoksik dalam menyerang dan membunuh sel kanker payudara pada tikus.

## BAHAN DAN METODE

### Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan eksperimen sebenarnya (*true experimental design*) *post test only* rancang acak kelompok (RAK). Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi FKUB selama 2 bulan.

### Hewan Coba

Hewan coba pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jenis kelamin betina, berusia 12-13 minggu dan dengan berat badan 150-250 g. Sampel berjumlah 25 ekor yang dibagi dalam 5 kelompok, yaitu (i) kontrol negatif (normal), (ii) kontrol positif (DMBA), (iii) perlakuan I (DMBA dan terapi EA selama 3 hari); (iv) perlakuan II (DMBA dan terapi EA selama 5 hari); (v) perlakuan III (DMBA dan terapi EA selama 10 hari).

### Protokol Pembuatan Tikus Model Kanker Payudara dengan Induksi DMBA

Penginduksian dilakukan dengan 3 kali induksi setiap minggu yang dilakukan setiap hari senin, Kamis dan Sabtu. Induksi dilakukan dengan dosis 10 mg/BB dengan pelarut 1 ml minyak jagung. Injeksi dilakukan di antara payudara abdominal. Dosis satu kali pemberian yaitu 1 ml yang diinjeksikan 0,5 ml di bagian kanan dan 0,5 ml di bagian kiri.<sup>4</sup>

### Pemberian Terapi Elektro-Akupunktur

Terapi EA dilakukan pada titik ST 36/Zusanli (5 mm di bawah fibula sendi lutut dan 2 mm lateralis ke tuberkulum anterior tibia) dengan frekuensi 15 Hz selama 30 menit selama 3, 5 dan 10 hari yang bertujuan untuk meningkatkan imunomodulator tubuh melawan kanker payudara.<sup>5,6</sup>

### Prosedur Pengambilan Darah Tikus

Pengambilan darah dilakukan dengan teknik aseptik, darah diambil dari jantung tikus. Tikus dianestesi dengan kloroform di dalam wadah tertutup hingga tikus mati, lalu tikus diletakkan di atas papan. Kemudian daerah dada tikus dicukur dan dibedah menggunakan pisau steril untuk membuka tulang dada. Setelah itu, darah diambil menggunakan spuit 3 cc dari jantung tikus dan ditampung pada tabung sentrifus, dan disentrifugasi selama 10 menit untuk mendapatkan serum dengan kecepatan 6000 rpm. Serum disimpan pada suhu -20 °C.

### Pengukuran Kadar IL-2

Interleukin-2 dalam serum darah tikus diukur dengan metode ELISA sandwich. Pada microplate ELISA ditambahkan 100 µL standard atau sampel ke dalam wells, kemudian lakukan inkubasi selama 90 menit pada suhu 37 °C. Setelah itu, ditambahkan 100 µL *biotinylated detection Ab*, kemudian inkubasi kembali selama 1 jam dengan suhu 37 °C. Setelah 1 jam, ditambahkan buffer ± 350 µL. Pencucian dilakukan 3 kali, pada pencucian terakhir dihilangkan cairan buffernya dengan melakukan aspirasi atau dituang, kemudian microplate dibalik pada kertas absorbent (tissue). Setelah bersih, ditambahkan 100 µL HRP conjugate, kemudian inkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C. Setelah itu, microplate ELISA dicuci sebanyak 5 kali. Pada microplate ditambahkan 90 µL substrat dan diinkubasi

selama 15 menit pada suhu 37 °C. Kemudian ditambahkan 50 µL stop solution pada masing-masing sumur. Hasil ELISA dibaca dengan mesin ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm.

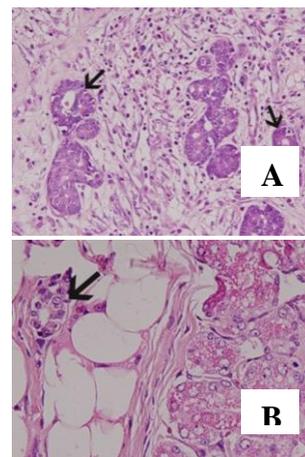
### Analisis data

Data dianalisis menggunakan uji Shapiro-Wilk untuk menilai normalitas data dan uji Levene untuk menguji kehomogenan data. Untuk menguji data *mean* antar kelompok uji menggunakan *one way ANOVA* dan uji LSD.

## HASIL

### Pengamatan Jaringan Payudara Tikus

Hasil pemeriksaan dapat dilihat pada Gambar 1. Pada Gambar 1A, terlihat sel epitel payudara memiliki inti sel tunggal, inti sel sama besar (monomorfik), hipokromatik, dan tidak terdapat proliferasi yang abnormal dan ditunjukkan dengan duktus intralobular yang masih terlihat dengan jelas dan renggang. Sementara pada Gambar 1B terlihat sel epitel payudara yang memiliki banyak inti, hiperkromatik, polimorfik, dan terdapat proliferasi berlebihan yang ditunjukkan dengan sel-sel yang rapat hingga hampir menutupi duktus intralobular.

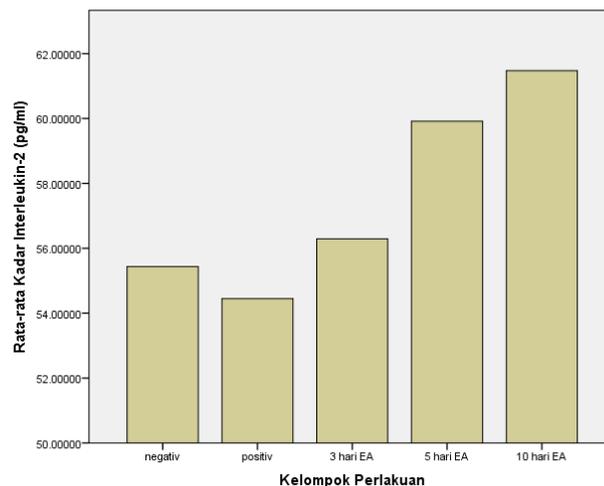


Gambar 1. Gambaran histologi jaringan payudara tikus. (A) Kontrol negatif, (B) Induksi DMBA (40x).

### Kadar Interleukin-2 pada Serum Darah Tikus

Pengukuran kadar IL-2 serum darah tikus dilakukan pada semua kelompok. Metode yang digunakan untuk mengukur kadar serum darah pada penelitian ini adalah metode ELISA *sandwich*. Pada Gambar 2 ditunjukkan rata-rata kadar IL-2 serum, yang terendah terdapat pada

kelompok II (tikus diet normal yang diinjeksi DMBA tanpa diberikan terapi EA) yaitu sebesar  $54,447 \pm 0,361$  pg/ml. Sementara itu, rata-rata kadar IL-2 serum yang tertinggi terdapat pada kelompok III (tikus diet normal yang diinjeksi DMBA dan diterapi EA pada titik ST 36 dengan frekuensi 15 Hz selama 30 menit dalam 10 hari berturut-turut) yaitu sebesar  $61,475 \pm 1,071$  pg/ml.



Gambar 2. Rata-rata kadar IL-2 serum tikus pada tiap kelompok perlakuan

Keterangan: kelompok I =  $55,434 \pm 0,634$  pg/ml; kelompok II =  $54,447 \pm 0,361$  pg/ml; kelompok III =  $56,291 \pm 0,346$  pg/ml; kelompok IV =  $59,915 \pm 0,628$  pg/ml; kelompok V =  $61,475 \pm 1,071$  pg/ml.

### Perbedaan Kadar IL-2 Serum Tikus pada Tiap Kelompok Berdasarkan Uji LSD

Hasil uji LSD pada Tabel 1 menunjukkan perbedaan kadar interleukin-2 tikus secara nyata antara kelompok II (kontrol positif) yaitu tikus yang diberikan diet normal serta diberikan injeksi DMBA tanpa diberikan terapi EA dan kelompok I yaitu tikus yang diberi diet normal, tanpa injeksi DMBA dan tanpa diberikan terapi EA ( $p = 0,029$ ). Perbedaan secara nyata juga didapatkan antara kelompok II (kontrol positif) dengan kelompok I (b), kelompok II (d) dengan kelompok III (e) nilai  $p < 0,05$ . Selain itu, pada Tabel 1 juga ditunjukkan adanya perbedaan kadar interleukin-2 yang berbeda secara nyata antar kelompok perlakuan (kelompok III, IV, dan V), dengan nilai  $p < 0,05$ .

Tabel 1. Perbandingan kadar IL-2 pada masing-masing kelompok berdasarkan uji LSD

Kelompok	Sig	95% CI
I	b	0,029 0,112-1,86
II	c	0,000 (-2,71)-(-0,96)
	d	0,000 (-6,34)-(-4,59)
	e	0,000 (-7,90)-(-6,15)
III	d	0,000 (4,49)-(-2,74)
	e	0,000 (-6,057)-(-4,30)
IV	e	0,001 (-2,43)-(-0,68)

### PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengamati peran elektro-akupunktur (EA) terhadap kadar interleukin-2 pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar yang diinduksi DMBA. Penginduksian payudara tikus dengan menggunakan DMBA bertujuan

untuk membuat tikus sebagai model kanker payudara. Penelitian ini menggunakan lima kelompok penelitian yang terdiri dari dua kelompok kontrol yaitu kontrol negatif dan kontrol positif. Pada kelompok kontrol negatif tikus diberikan diet normal tanpa induksi DMBA dan tanpa terapi EA, sedangkan kontrol positif adalah tikus yang diberi diet normal serta diberikan induksi DMBA namun tanpa terapi EA. Pada kelompok perlakuan, tikus diberi diet normal, diinduksi DMBA, dan diterapi EA pada titik Zusanli (ST 36) dengan frekuensi 15 Hz dalam 30 menit selama 3 hari (kelompok III), 5 hari (kelompok IV), dan 10 hari (kelompok V) secara berturut-turut.

### Induksi DMBA

DMBA merupakan senyawa karsinogen spesifik untuk eksperimental kanker payudara dan kanker kulit pada hewan percobaan.<sup>7</sup> DMBA telah digunakan secara luas sebagai penginduksi dalam pemeriksaan keberhasilan agen kemoterapi dalam menghambat pembentukan kanker payudara pada setting pre klinis.<sup>1</sup>

Pemeriksaan histologi terhadap jaringan payudara tikus yang diinduksi DMBA maupun tikus yang diinjeksi dengan minyak jagung dilakukan dengan pewarnaan hematoksilin-eosin dan diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 40 kali (Gambar 1).

Gambaran jaringan payudara tikus pada kelompok kontrol negatif, yaitu tikus yang hanya disuntik minyak jagung ditunjukkan pada Gambar 1A. Pada Gambar 1A sel payudara memiliki inti sel tunggal, inti sel sama besar (monomorfik), hipokromatik, dan tidak terdapat proliferasi yang abnormal ditunjukkan dengan duktus intralobular yang masih terlihat dengan jelas dan renggang. Kelenjar mammae nonlaktasi ditandai dengan banyak jaringan ikat dan sedikit unsur kelenjar. Lobules mengandung kelompok-kelompok tubuli kecil, yang dilapisi epitel kuboid atau silindris rendah. Tubuli ini mirip

duktus dan tetap dalam tahap ini selama kelenjar mammae tidak aktif. Kadang-kadang terlihat tubulus yang lebih nyata, seperti duktus intralobular kecil atau duktus ekskretorius intralobular besar yang dikelilingi oleh jaringan ikat intralobular longgar dan halus yang mengandung fibroblast, limfosit, sel plasma dan eosinophil.<sup>8</sup>

Sementara itu, gambaran histologi pada tikus yang diberikan induksi DMBA terlihat pada Gambar 1B. Pada gambar tersebut, sel payudara memiliki banyak inti, hiperkromatik, polimorfik, dan menunjukkan proliferasi berlebihan yang ditandai dengan sel-sel yang rapat hingga hampir menutupi duktus intralobular. Adanya proliferasi yang berlebihan ke arah dalam lobuler menunjukkan terjadinya karsinoma lobuler *in situ*. Pada jaringan payudara yang terkena kanker terjadi hiperplasia epitel yang tidak khas dan sering didominasi oleh perubahan fibrosa atau kistik. Secara histologis, spektrum perubahan proliferasi hampir bersifat tak-terbatas, nukleus bervariasi dari derajat rendah dan monomorfik hingga derajat tinggi dan heterogen (polimorfik). Lobuler mungkin terisi oleh sel kuboid yang tersusun teratur, yang di dalamnya bisa jadi memperlihatkan pola kelenjar kecil (fenestrasi). Kadang-kadang epitel yang berproliferasi menjorok ke dalam lumen duktus dalam bentuk tonjolan-tonjolan papilaris kecil (papilomatosis duktus). Di dalam asinus, sel normal diganti oleh sel yang relative seragam, bersitoplasma jernih dan tersusun longgar, serta non-kohef. Ukuran asinus secara umum meningkat, tetapi bentuk lobulernya tetap tidak berubah.<sup>9,10</sup>

### Kadar Interleukin-2

Kadar interleukin-2 diukur dari serum darah tikus yang diambil dari jantung, setelah dilakukan induksi dan terapi elektro-

akupunktur. Kadar interleukin-2 diukur menggunakan metode ELISA *sandwich*

Berdasarkan uji ANOVA diketahui ada perbedaan secara nyata pada kadar interleukin-2 dari masing-masing kelompok ( $p = 0,000$ ). Selanjutnya dilakukan analisis *post hoc test* untuk mengetahui signifikansi perbedaan kadar interleukin-2 diantara masing-masing kelompok penelitian.

Kadar interleukin-2 secara nyata/signifikan lebih tinggi pada kelompok I dibandingkan dengan kelompok II dengan nilai  $p = 0,029$  yang ditunjukkan pada Tabel 1. Perbedaan yang bermakna ini menunjukkan bahwa induksi DMBA yang menimbulkan kanker payudara pada tikus memberikan efek berupa penurunan kadar interleukin-2 dibandingkan kelompok tikus tanpa induksi DMBA. Hal ini sejalan dengan studi yang dilakukan oleh Toris (1985) yang mengungkapkan bahwa sel kanker dapat secara signifikan menurunkan Th-1/Th-2 dan rasio sel dendritik, adanya penurunan aktivitas Th-1 berdampak terhadap menurunnya aktivasi IL-2 sehingga terjadi penurunan terhadap kadar IL-2.<sup>2,11</sup>

Kadar interleukin-2 pada tikus juga memiliki perbedaan secara nyata antara kelompok II dengan kelompok III, kelompok IV, juga kelompok V dengan nilai  $p < 0,05$  seperti yang ditunjukkan pada Table 1. Berdasarkan hasil pengujian di atas menunjukkan bahwa pemberian terapi EA pada tikus yang diinduksi DMBA terbukti efektif dalam meningkatkan kadar Interleukin-2 pada tikus secara bermakna. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Cheng *et al* (2002) yang menyatakan bahwa adanya terapi Elektro-Akupunktur dapat secara efektif mengaktifkan encephalin,  $\beta$ -endorphin dan endomorphin secara simultan. Dalam penelitiannya Cheng (2002) menggunakan 3 frekuensi yaitu 2 Hz, 15 Hz dan 100 Hz. Setelah dilakukan EA didapatkan bahwa terapi EA dengan frekuensi 15 Hz dapat mengaktivasi

interleukin-2 lebih banyak dibandingkan dengan frekuensi 2 Hz dan 100 Hz.<sup>12</sup>

Selanjutnya kadar interleukin-2 pada kelompok III dibandingkan dengan kelompok IV dan kelompok V, diketahui berbeda secara nyata dengan nilai  $p < 0,05$  ( $p = 0,000$ ;  $p = 0,000$ ) seperti yang ditampilkan pada Tabel 1. Selain itu, juga diketahui adanya perbedaan yang nyata pada kelompok IV dan kelompok V, dengan nilai  $p = 0,001$ .

Berdasarkan rata-rata kadar interleukin-2 pada Gambar 2 dan data hasil uji pada Tabel 1, terdapat perbedaan yang nyata pada tiap kelompok perlakuan (kelompok III, IV dan V) dengan nilai  $p < 0,05$ . Terapi elektro-akupunktur dapat memberikan perbedaan kadar interleukin-2 secara signifikan yaitu semakin banyak hari atau dosis terapi elektro-akupunktur yang diberikan maka nilai rata-rata kadar interleukin-2 akan meningkat jika dibandingkan dengan tikus yang tidak diberikan terapi elektro-akupunktur. Hal ini terlihat dari pemberian terapi EA selama 3 hari yang memiliki rata-rata kadar IL-2 paling sedikit diantara kelompok perlakuan yaitu  $55,434 \pm 0,634$  pg/ml, sedangkan pemberian terapi EA selama 10 hari memiliki rata-rata kadar interleukin-2 paling banyak pada tikus kelompok perlakuan yaitu  $61,475 \pm 1,071$  pg/ml. Selanjutnya, didapatkan hasil bahwa tindakan EA yang paling efektif untuk meningkatkan kadar interleukin-2 adalah terapi EA yang diberikan pada titik ST 36 dengan frekuensi 15 Hz selama 30 menit dalam sepuluh hari berturut-turut.

Kondisi kanker payudara di dalam tubuh akan memicu terjadinya perlawanan oleh sistem imun untuk memerangi sel kanker namun sel kanker dapat menghindari deteksi dan terus tumbuh. Sel-sel kanker akan mengeluarkan zat-zat yang menciptakan dominasi terhadap Th-2 dan membuat tubuh kurang mampu melawan sel kanker. Pada studi yang dilakukan oleh Kondo dan Toris

(1985) mengindikasikan bahwa sel kanker dapat secara signifikan menurunkan Th-1/Th-2 dan rasio sel dendritik (DC1/DC2).<sup>11</sup> Adanya penurunan aktivasi pada Th1 akan menurunkan rangsangan Th-1 terhadap proliferasi IL-2 yang akan menurunkan efisiensi perlawanan respon imun terhadap sel kanker.<sup>2</sup> Adanya stimulasi pada titik akupunktur ST36 dapat mengaktifkan jaringan neurotransmitter di otak, pada tingkat sel stimulasi di titik ST36 dapat menginduksi sintesis enzim nitrat oxide (NO) dalam keratinosit. Sel-sel kulit yang menghasilkan neurotransmitter NO akan mengirimkan sinyal melalui sumsum tulang belakang ke otak. Akupunktur dapat merangsang sinyal hipotalamus-hipofisis-andrenal (HPA) untuk melepaskan neurotransmitter opioid endogen ( $\beta$ -endorphin), yang bergerak dari otak ke darah menuju lokasi yang mengandung sel-sel kekebalan tubuh.

Adanya rangsangan tersebut mengakibatkan Th-1 teraktivasi dan meningkatkan rangsangan produksi IL-2, sehingga menimbulkan peningkatan pada kadar IL-2 pada tubuh. Hal ini akan meningkatkan pengaktifan sel NK (*natural killer*), produksi IFN- $\gamma$  dan peningkatan produk-produk sitokin yang memiliki sifat tumorisidal atau aktifitas sitolitik terhadap sel-sel tumor, sehingga dapat menekan pertumbuhan tumor secara langsung. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa akupunktur pada ST 36 dapat meningkatkan IL-2 baik pada tikus maupun pada manusia. Temuan ini menunjukkan bahwa stimulasi akupunktur pada ST 36 juga menghasilkan kaskade molekular berurutan sepanjang baris berikut: tusuk jarum meningkatkan sekresi IL-2, yang mengnduksi peningkatan ekspresi NKp44, sehingga menyebabkan peningkatan aktifitas sitolitik sel NK.<sup>7</sup>

## KESIMPULAN

Penelitian ini membuktikan bahwa pemberian terapi elektro-akupunktur dapat memberikan perbedaan terhadap rata-rata kadar interleukin-2 serum pada tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar yang diinduksi DMBA.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Abascal K, Yarnell E. *A Turkey Tails Polysaccharide as an Immunotherapy Agent in Cancer*. Washigton: Mary Ann Liebert, Inc. 2007.
2. Corwin EJ. *Patofisiologi: Buku Saku*. Jakarta: EGC. 2009.
3. Dandekar *et al*. Specific Activation of the Cellular Harvey-Ras Oncogene in Imethylbenzanthracene-Induced Mouse Mammary Tumors. *Mol Cell Bio*. 1 1986; 6:4104–4108.
4. Eroschenko VP. *Atlas Histologi di Fiore dengan Korelasi Fungsional*. Jakarta: EGC. 2003.
5. Griana TP. *Gambaran Histopatologi Gaster Mencit Hibrid F1 (C3hxaj) yang Diinokulasi Tumor Adenocarcinoma Mamma secara Intravena, Intraperitonial dan Subkutan*. Malang: El-Hayah UIN Maliki Malang. 2012.
6. Han JS. Mini Review: Acupunture and Endorphins. *Neuro Science Letters*. 2004; 361:258-261.
7. Johnston, MF *et al*. Acupunture may Stimulate Anticancer Immunity via Activation of Natural Killer Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. USA: Hindawi Publishing Corporation. 2009.
8. Kirubha S *et al*. 7,12-Dimethylbenz(a) Anthracene-Induced Wister Rats by Asymmetrical Temperature Distribution Analysis using Thermography: A Comparison with Serum CEA Levels and

- Histopathology. *Journal of Biomedecine and Biotechnology*. 2012; p11.
9. Kumar V et al. *Robbins Basic Pathology*. 8<sup>th</sup> Edition. Elsevier Inc. 2007. p 745.
  10. Padmavathi R et al. *Therapeutic Effect of Paclitaxel and Propolis on Lipid Peroxidation and Antioxidant System in 7,12 Dimethyl Benz(A)Anthracene-Induced Breast Cancer In Female Sprague Dawley Rats*. *Life Sciences*. 2006; 78:2820 – 2825.
  11. Purwoastuti E. *Kanker Payudara: Pencegahan dan Deteksi Dini*. Yogyakarta: Penerbit: Kanisius. 2008.
  12. Underwood J. *Patologi Umum dan Sistemik*. Jakarta: EGC. 2000.