PROPOSAL PENELITIAN
LABORATORIUM HAYANDRA

Penelitian

Nama :	Karina	Gelar :	Dr. dr. -, Sp-BP-RE
Nama:	Tommy P. Sibuea	Gelar :	Dr. - Sp.PD., FINASIM
Nama:	Difky Ernanda	Gelar :	S.Si
Nama:	Irsyah Afini	Gelar :	M. Biomed
Nama:	Hafizh Zahra	Gelar :	M.Si

Penanggung Jawab

Nama:	Anabel Abiyyah Nugroho	Gelar:	M. Biomed

Judul Riset

Evaluasi Imunoterapi Seluler In Vivo: Terapi Sel NK/T pada Tikus Putih yang Diinduksi Karsinogen Benzo(a)Pyrene

Abstrak

Imunoterapi seluler telah menjadi pendekatan yang menjanjikan dalam pengobatan kanker, termasuk kanker payudara yang sulit diobati seperti triple-negative breast cancer (TNBC). Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas terapi sel T dan sel NK pada model in vivo. Studi in vivo dilakukan pada tikus yang diinduksi kanker payudara dengan Benzo(a)Pyrene. Tikus-tikus tersebut dibagi dalam kelompok kontrol dan perlakuan dengan dosis sel imun berbeda (1 juta, 5 juta, 10 juta, dan 15 juta sel). Parameter yang dianalisis dalam studi in vivo meliputi berat organ tumor, kadar IFN-gamma dan TNF-alpha menggunakan ELISA, serta analisis apoptosis, termasuk penandaan CD8, CD56, CD3, NKG2D, dan HER2 menggunakan flowsitometer. Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengungkap potensi

imunoterapi seluler dalam menghambat pertumbuhan dan metastasis sel kanker payudara, sehingga dapat menjadi alternatif terapi yang lebih efektif di masa depan.

Kata Kunci Berikan maksimum 4 kata kunci (*key words*)

Imunoterapi Seluler	In Vivo
Sel Imun	Benzo(a)Pyrene

Persetujuan Penanggung Jawab

Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Anabel Abiyyah Nugroho, S.Si., M.Biomed		14 Januari 2024

Latar Belakang

Imunoterapi telah menjadi bidang yang menjanjikan dalam pengobatan kanker, memanfaatkan dan memperkuat kemampuan sistem imun untuk melawan tumor.[1] Selama beberapa dekade terakhir, berbagai pendekatan terapi kanker telah dikembangkan, termasuk pembedahan, radiasi, kemoterapi, terapi hormonal, terapi target, terapi sel punca, dan imunoterapi. Di antara berbagai metode tersebut, imunoterapi menunjukkan peningkatan signifikan dalam kelangsungan hidup dan kualitas hidup pasien kanker dibandingkan dengan terapi standar sebelumnya[2]. Imunoterapi mencakup beberapa pendekatan, seperti penghambat titik pemeriksaan imun (immune checkpoint inhibitors, ICIs), vaksin kanker, antibodi monoklonal, modulator sistem imun, dan terapi berbasis sel imun.[1,3–5] Penelitian ini secara khusus akan menyoroti imunoterapi berbasis sel, terutama peran sel T dan sel NK dalam pengobatan kanker. Pendekatan ini menggunakan sel-sel imun yang dioptimalkan untuk mengenali dan menghancurkan sel kanker, sehingga berpotensi menjadi strategi terapi yang efektif.

Kanker payudara merupakan salah satu dari tiga jenis kanker yang paling umum di seluruh dunia dan merupakan jenis kanker yang paling sering terjadi pada wanita. Secara statistik, satu dari delapan hingga sepuluh wanita akan mengembangkan kanker payudara selama hidup mereka.[6] Data statistik terbaru menunjukkan bahwa 40% pasien kanker payudara masih mengalami *distant metastasis* (DM) setelah menjalani pengobatan standar, yang akhirnya dapat menyebabkan kematian.[7] Untuk terapi in vivo sendiri akan dilakukan pada tikus yang diinduksi dengan Benzo(a)Pyrene. Benzo[a]pyrene (B(a)P) adalah karsinogen lingkungan yang dikenal luas dan ditemukan dalam makanan seperti daging yang dimasak, sereal, serta asap rokok.[10,11] Bahan ini dikaitkan dengan perkembangan kanker payudara karena kemampuannya merusak DNA dan memicu jalur inflamasi[12]. B(a)P diaktifkan secara metabolik oleh enzim sitokrom P450 menjadi spesies reaktif yang menyebabkan mutasi pada DNA, memulai proses karsinogenesis. Selain itu, B(a)P memicu peradangan melalui aktivasi TNF-α, NF-κB, dan COX-2, yang mengarah pada produksi sitokin seperti IL-6, yang meningkatkan migrasi, invasi, dan metastasis sel kanker[10]. Kombinasi efek genotoksik dan non-genotoksik ini berkontribusi pada perkembangan dan progresivitas kanker payudara[10,11,13] Saat ini, imunoterapi seluler untuk pasien kanker payudara masih dalam tahap perkembangan yang sangat aktif dan menjanjikan. Penelitian dan inovasi terus berlanjut untuk meningkatkan efektivitas dan keamanan berbagai pendekatan imunoterapi.

Maka dari itu, peneliti merasa penting untuk melakukan penelitian in vitro dan in vivo untuk terapi imun sel pada pasien kanker payudara. Penelitian ini bertujuan untuk memahami bagaimana interaksi antara sel kanker dan sistem imun, serta mengeksplorasi potensi terapi berbasis imun untuk menghambat pertumbuhan dan penyebaran sel kanker. Dengan memahami mekanisme molekuler yang terlibat dalam proses ini, diharapkan terapi imun sel dapat menjadi alternatif yang efektif dalam pengobatan kanker payudara di masa depan.

Permasalahan

Rumusan Masalah

Meskipun terapi konvensional telah banyak digunakan dalam pengobatan kanker payudara, efektivitasnya masih terbatas dalam hal keberhasilan jangka panjang dan dampak terhadap pasien. Oleh karena itu, muncul kebutuhan untuk mengeksplorasi terapi alternatif yang lebih efektif. Salah satu pendekatan yang menjanjikan adalah terapi seluler, khususnya penggunaan sel NK (natural killer) dan sel T, yang memiliki potensi untuk meningkatkan respons imun tubuh terhadap sel kanker. Namun, masih diperlukan penelitian lebih lanjut, terutama di bidang in vivo, untuk memahami sejauh mana terapi seluler ini dapat meningkatkan hasil pengobatan kanker payudara dibandingkan dengan terapi konvensional.

Pertanyaan

1. Bagaimana respons imun tubuh terhadap terapi sel NK dan sel T pada model tikus putih yang diinduksi kanker payudara menggunakan benzo(a)pyrene dalam uji in vivo?
2. Apakah variasi dosis memengaruhi efektivitas terapi sel NK dan sel T pada model tikus putih yang diinduksi kanker payudara dengan Benzo(a)pyrene dalam uji in vivo?

Hipotesis

1. Pada model tikus putih yang diinduksi kanker payudara dengan benzo(a)pyrene, terapi sel NK dan sel T akan meningkatkan respons imun tubuh dan menghambat perkembangan kanker.
2. Variasi dosis terapi sel NK dan sel T berpengaruh signifikan terhadap efektivitas pengobatan kanker payudara pada model tikus putih yang diinduksi dengan Benzo(a)pyrene dalam uji in vivo.

Tujuan Riset

Tujuan Umum:

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengeksplorasi efektivitas terapi seluler, khususnya sel NK (natural killer) dan sel T, dalam meningkatkan respons kekebalan terhadap kanker payudara, serta untuk mengevaluasi potensi terapi ini sebagai alternatif pengobatan yang lebih efektif dibandingkan dengan terapi konvensional.

Tujuan Khusus:

1. Menilai respons imun tubuh terhadap terapi sel NK dan sel T pada model tikus putih yang diinduksi kanker payudara menggunakan benzo(a)pyrene dalam studi in vivo.
2. Membandingkan efektivitas terapi sel NK dan sel T secara individual dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara.

Rencana Riset

a. Rancangan Penelitian.

Studi in vivo akan menggunakan tikus putih yang diinduksi dengan benzo(a)pyrene untuk menciptakan model kanker payudara. Eksperimen in vivo ini akan dibagi menjadi enam kelompok perlakuan, yaitu: (1) kelompok kontrol positif, di mana tikus diinduksi dengan Benzo(a)pyrene tanpa perlakuan lebih lanjut; (2) kelompok kontrol negatif, yaitu tikus normal tanpa induksi atau perlakuan; (3) kelompok perlakuan di mana tikus diinduksi dengan Benzo(a)pyrene dan diberi sel pada dosis 1 juta, 5 juta, 10 juta, dan 15 juta sel. Sel imun yang digunakan pada kelompok 3 dibagi menjadi dua tipe, yaitu sel imun dari PBMC yang dikultur dengan mediun sel T dan sel imun dari PBMC yang dikultur dengan medium sel NK.

b. Donor Sampel Darah Dari Pasien Sehat dan Pasien Kanker Pra dan Pasca Terapi Imunosel

Eksperimen ini dilakukan di hayandra laboratorium dengan menggunakan donor darah subjek terdiagnosa kanker payudara. Berikut merupakan kriteria inklusi dan eksklusi dari penelitian ini:

Kriteria Inklusi Donor Darah Kanker

c. Berusia diatas 18 tahun.
d. Jenis kelamin perempuan
e. Memiliki diagnosis kanker payudara solid yang pasti
f. Kanker pada stadium 1, 2, 3 atau 4
g. Setidaknya empat minggu sejak kemoterapi atau terapi radiasi terakhir pasien
h. jumlah leukosit ≥3,000/µl, jumlah neutrofil ≥1,500/µl, jumlah trombosit ≥80,000/µl, hemoglobin ≥9,0 g/dl, kreatinin serum ≤1,5 mg/dl, bilirubin serum ≤2,5 × batas atas kisaran normal institusi
i. Bersedia menjadi responden penelitian dengan menandatangani informed consent

Kriteria Eksklusi Donor Darah Sehat dan Pasien Kanker

j. Darah dengan HIV, hepatitis, dan kondisi kejiwaan atau kecanduan obat
k. Hamil
l. Riwayat gangguan autoimun
m. Alasan lain yang menurut penyidik, menghalangi subjek untuk berpartisipasi dalam penelitian atau membahayakan keselamatan subjek

n. Pengambilan Sampel Darah dan Isolasi Sel Mononuklear Darah Perifer

Darah utuh (22,5 mL) dari donor sehat dalam tabung vacutainer plain (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, AS) disentrifugasi pada kecepatan 1500 g, selama 10 menit pada suhu ruang (akselerasi 7, perlambatan 7). Serum hasil sentrifugasi dikumpulkan dan disimpan pada suhu 4-80C untuk selanjutnya digunakan pada proses pengkulturan. Darah utuh (90 mL) dari donor sehat dikumpulkan dalam vacutainer lain yang mengandung li-heparin (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, AS). Sebanyak 2 tabung diantaranya (±9 mL) dipindahkan ke dalam botol BacT alert untuk dilakukan uji sterilitas. Sel mononuklear darah perifer diisolasi dari darah utuh melalui pengenceran dengan HBSS dengan perbandingan 1:1. Campuran darah-HBSS dituangkan secara perlahan pada tabung yang sudah berisi Ficoll dengan perbandingan 2:1, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm, 10 menit pada suhu ruang (akselerasi 7, perlambatan 1). Lapisan plasma dikumpulkan dan disimpan pada suhu 4-80C, sedangkan lapisan buffy coat dikumpulkan dalam tabung sentrifugasi dan dicuci dua kali dengan HBSS melalui sentrifugasi secara berturut-turut pada kecepatan 300 g dan 200 g, masing-masing selama 10 menit pada suhu ruang (akselerasi 7, perlambatan 7). Sel hasil pencucian dikulturkan dengan medium pertumbuhan pada flask terlapisi aktivator. Dilakukan penghitungan sel, menggunakan rumus sebagai berikut[15] :

Jumlah Sel : $\frac{Jumla\ sel\ yang\ mati\ dan\ hidup}{5\ (chamber)}\ x\ DF\ x\ 10^4\ x\ volume\ suspensi\ sel$

di mana Df adalah faktor pengenceran. Formula berikut digunakan untuk menghitung viabilitas sel:

$$Viabilitas\ Sel: \frac{Jumlah\ sel\ Hidup}{Jumlah\ Sel\ Hidup + Sel\ Mati}\ x\ 100\%$$

o. Kultur Sel T Untuk Terapi Imunosel

Sel PBMC yang terisolasi dikultur dengan medium pertumbuhan KBM 581 (Kohjin Bio, JP) dan 5% serum pada *flask* T225 yang telah terlapisi aktivator sel T CD3 (TONBO, JP) dengan tingkat kerapatan 1 x 10^6 sel/1 mL medium komplit. Observasi berkala setiap 2-3 hari sekali dilakukan baik secara visual melalui pengamatan mikroskop maupun penghitungan jumlah dan viabilitas sel, penambahan media disesuaikan pada kerapatan 1 x 10^6 sel/1 mL medium komplit. Pada hari ke-5 kultur, dilakukan pemindahan kultur sel dari *flask* menuju *bag* untuk proses ekspansi sel dengan penggunaan media pertumbuhan KBM 550 (Kohjin Bio, JP). Pemeliharaan dilakukan setiap 2-3 hari

sekali dengan penyesuaian kerapatan 1 x 10^6 sel/1 mL medium komplit, panen dilakukan pada hari ke-14 kultur.

p. Kultur sel NK

Sel PBMC yang terisolasi dikultur dengan medium pertumbuhan NKCC1 (Kohjin Bio, JP) dan 5% serum pada *flask* T75 yang telah terlapisi aktivator NKCC-c (Kohjin Bio, JP) dengan tingkat kerapatan 1 x 10^6 sel/1 mL medium komplit. Observasi berkala setiap 2-3 hari sekali dilakukan baik secara visual melalui pengamatan mikroskop maupun penghitungan jumlah dan viabilitas sel, penambahan media disesuaikan pada kerapatan 1 x 10^6 sel/1 mL medium komplit. Pada hari ke-5 kultur, dilakukan pemindahan kultur sel dari *flask* menuju *bag* untuk proses ekspansi sel dengan penggunaan media pertumbuhan NKCC2 dan 5% plasma. Pemeliharaan dilakukan setiap 2-3 hari sekali dengan penyesuaian kerapatan 1 x 10^6 sel/1 mL medium komplit, panen dilakukan pada hari ke-14 kultur.

q. Jumlah Sampel Hewan Uji

Penentuan jumlah replikasi ditentukan dengan rumus Federer yaitu (t- 1) (r-1) ≥15[16]. Dengan keterangan t merupakan banyaknya kelompok perlakuan dan r merupakan jumlah replikasi. Sehingga mendapatkan perhitungan :

$$(t-1)\,(r-1) \geq 15$$
$$(6-1)\,(r-1) \geq 15$$
$$5r - 5 \geq 15$$
$$r \geq 4$$

Dengan demikian, jumlah pengulangan yang dilakukan adalah empat kali untuk setiap kelompok perlakuan, dengan total enam kelompok perlakuan, yaitu: kontrol negatif (tikus normal), kontrol positif (tikus yang diinduksi Benzo(a)Pyrene), serta empat kelompok tikus yang diinduksi Benzo(a)Pyrene dan diberi terapi sel T dengan dosis masing-masing 1 juta, 5 juta, 10 juta, dan 15 juta.

r. Persiapan Hewan Uji dan Perlakuan terhadap Hewan Uji

Tikus NGS berusia 6 sampai 10 minggu diaklimatisasi terlebih dahulu selama tujuh hari sebelum diberi perlakuan. Tikus dipelihara di dalam ruangan dengan suhu ruang. Waktu penyinaran 12 jam terang dan 12 jam gelap.[17] Pada tikus yang diinduksi dengan benzo(α)pyrene, larutan benzo(α)pyrene dibuat dengan melarutkan 100 mg serbuk benzo(α)pyrene ke dalam 100 mL minyak zaitun. Pada penelitian ini, diperlukan dosis sebesar 0,3 mg/20 g berat badan hewan per hari selama 14 hari. Larutan ini diberikan kepada hewan uji melalui injeksi subkutan di daerah payudara kanan untuk memastikan paparan langsung terhadap jaringan target.[18] 14 hari setelah injeksi benzo(α)pyrene, tikus menerima sel T melalui injeksi vena ekor sesuai dengan dosis yang sudah ditentuka, yaitu 1 juta, 5 juta, 10 juta dan 15 juta. Tikus dipantau setiap hari selama 14 hari.[19]

s. Pengamatan Berat Organ Payudara setelah Perlakuan

Setelah disuntikan sel imun NKT, selanjutnya organ payudara diambil dan dibersihkan. Organ payudara kemudian ditimbang serta ditentukan berat organ relatif terhadap berat masing-masing hewan uji. Pengukuran berat organ relatif dilakukan dengan cara perhitungan sebagai berikut[20]:

$$\text{Berat Relatif Organ} = \frac{Berat\ organ\ absolut\ (g)}{Berat\ Badan\ (g)}\ x\ 100\%$$

t. Analisis Sitokin pada Sampel Darah dan Organ menggunakan ELISA

Darah diambil melalui jantung tikus dengan menggunakan *syringe*. Darah yang keluar ditampung pada tabung *venoject* sebanyak ± 4ml. Darah yang telah diambil disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Serum diambil dan ditempatkan pada Tabung *eppendorf* baru. Plasma diuji menggunakan ELISA Kit IFN-γ dan ELISA Kit TNF-α.[21]

u. Flowcytometry Analysis

a. Pemeriksaan Flowsitometer CD 8^+, CD 3^+, CD 56^+, CD NKG2D$^+$, CD 19^+

Pertama, Dilakukan pengambilan sampel darah dan isolasi sel mononuklear darah perifer pada hewan coba. Setelah mendapatkan sel mononuklear darah perifer, Suspensi sel ditampung dalam tube 15 ml kemudian disentrifugasi 1200 rpm, 5 menit. Ditambahkan 300 ul PBS (tuliskan kode sampel – unstained di tube) kemudian vortex. Selanjutnya diambil 100 ul ke tube baru (beri kode sampel-sample). Kemudian, ditambahkan antibodi sebanyak 5uL ke tube sampel, kemudian vortex. Antibodi yang ditambahkan sebagai berikut : (1) Anti-Human CD3 FITC clone: Hit3a (Tonbo Bioscience 35-0039-T100), (2) Anti-Human CD19 PerCP-Cyanine 5.5 Clone: HIB19 (Tonbo Bioscience : 65-0199-T100), (3) Anti-Human CD56 (N CAM) PE Clone: MY31 (Tonbo

bioscience : 50-0564-T100), (4) Anti-Human CD8 APC Clone : SK1 (Tonbo Bioscience: 20-0087-T100), (5) PE-Cy^{TM}7 Mouse Anti-Human CD314 (NKG2D) Clone:1D11(BD Pharmingen^{TM}: 562365). Kemudian diinkubasi 15 menit di ruang gelap. Selanjutnya ditambahkan 1 mLlPBS, vortex kemudian sentrifugasi 1200 rpm 5 menit dan ditambahkan 300 ul PBS 1x kemudian baca menggunakan alat flowsitometer.

b. Pemeriksaan Flowsitometer HER 2 (*Breast Cancer*)

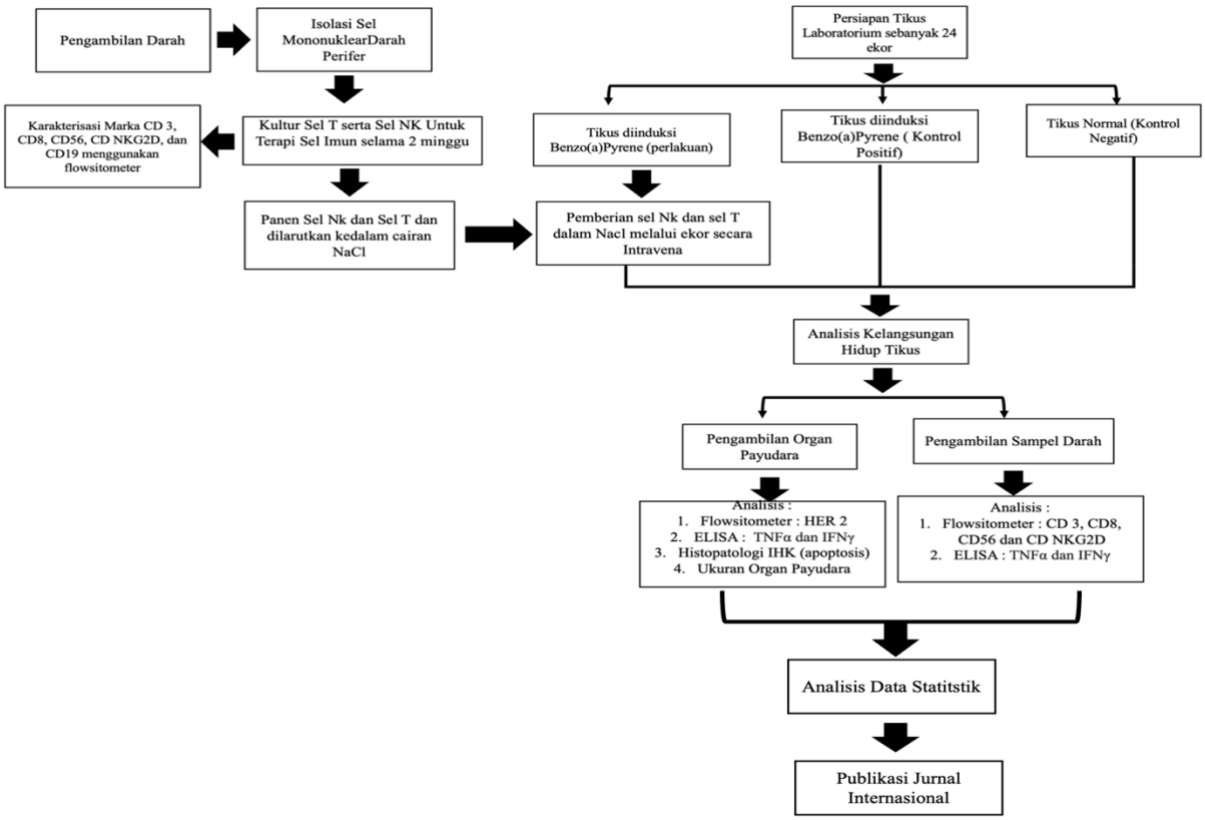
Jaringan tumor tikus didisosiasi menggunakan Miltenyi mouse tumour dissociation kit dan gentleMACS Octo Dissociator untuk mendapatkan suspensi sel tunggal. Limpa dan tumour-draining lymph nodes (TdLN) dari area aksila, inguinal, dan serviks dikumpulkan, lalu dihancurkan melalui penyaring 70 µm dengan plunger jarum suntik 3 mL. Limpa yang didisosiasi menjalani lisis eritrosit menggunakan ACK buffer untuk menghilangkan sel darah merah. Selanjutnya, 2 x 10^6 sel dari setiap sampel disuspensikan dalam 200 µL FACS buffer (0,5% BSA-PBS).[22] Untuk pengecekan menggunakan flow sitometer, tambahkan volume yang sesuai dari antibodi monoklonal terkonjugasi fluoresensi D Anti–HER-2/neu (APC), dengan no. catalog 340554 ke dalam suspensi sel sebanyak 10^6 sel. Campur hingga merata dan inkubasi selama 15 hingga 30 menit dalam kondisi gelap pada suhu ruang (20–25°C). Setelah inkubasi, cuci sel dengan 1X PBS yang mengandung 0,1% natrium azida untuk menghilangkan antibodi yang tidak terikat. Tambahkan 0,5 mL paraformaldehida 1% untuk memfiksasi sel, campur kembali hingga merata, dan segera lakukan analisis menggunakan flow sitometer.

v. Data Analisis

Untuk analisis data antar kelompok dengan medium berbeda, data normal dinyatakan sebagai mean ± SD dan perbandingan statistik antara medium dilakukan menggunakan analisis varians (ANOVA) satu arah pada $\alpha = 0,05$ dengan taraf kepercayaan 95%. Sedangkan untuk karakterisasi flowsitometri sel imun sebelum dan sesudah perlakuan, analisis statistik dilakukan menggunakan uji t-test untuk mengidentifikasi perbedaan signifikan dalam parameter sel imun.

Alur Penelitian

a. Alur Penelitian



Jadwal Penelitian Cantumkan lama penelitian dan rincian jadwal secara skematis.

a. Jadwal Penelitian

No	Nama Kegiatan	Bulan											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3	Persiapan Alat dan Bahan	V	V										
4	Persiapan hewan uji		V	V									
	Validasi hewan uji			V	V								
	Kultur sel T dan sel NK					V							
	Induksi Hewan uji untuk perlakuan					V							
	Injeksi sel T dan sel NK pada hewan uji						V	V					
7	Analisis Data							V	V	V			
8	Pembuatan Manuskrip dan Publikasi Hasil Penelitian										V	V	V

Daftar Pustaka

1. Kumar M, Thangavel C, Becker RC, Sadayappan S. Monoclonal Antibody-Based Immunotherapy and Its Role in the Development of Cardiac Toxicity. *Cancers (Basel)*. 2020;13(1):86. doi:10.3390/cancers13010086
2. Lee S, Kim T-D. Breakthroughs in Cancer Immunotherapy: An Overview of T Cell, NK Cell, Mφ, and DC-Based Treatments. *Int J Mol Sci*. 2023;24(24):17634. doi:10.3390/ijms242417634
3. Tan S, Day D, Nicholls SJ, Segelov E. Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Oncology. *JACC CardioOncology*. 2022;4(5):579-597. doi:10.1016/j.jaccao.2022.09.004
4. Taefehshokr N, Baradaran B, Baghbanzadeh A, Taefehshokr S. Promising approaches in cancer immunotherapy. *Immunobiology*. 2020;225(2):151875. doi:10.1016/j.imbio.2019.11.010
5. Hosseinkhani N, Derakhshani A, Kooshkaki O, et al. Immune Checkpoints and CAR-T Cells: The Pioneers in Future Cancer Therapies? *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):8305. doi:10.3390/ijms21218305
6. Simu S, Marcovici I, Dobrescu A, et al. Insights into the Behavior of Triple-Negative MDA-MB-231 Breast Carcinoma Cells Following the Treatment with 17β-Ethinylestradiol and Levonorgestrel. *Molecules*. 2021;26(9):2776. doi:10.3390/molecules26092776
7. Huang Z, Yu P, Tang J. Characterization of Triple-Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Spheroid Model. *Onco Targets Ther*. 2020;Volume 13:5395-5405. doi:10.2147/OTT.S249756
8. Lim HK, Lee H, Moon A, Kang K-T, Jung J. Exploring protocol for breast cancer xenograft model using endothelial colony-forming cells. *Transl Cancer Res*. 2018;7(5):1228-1234. doi:10.21037/tcr.2018.09.09
9. Akshata Desai KA. Triple Negative Breast Cancer – An Overview. *Hered Genet*. Published online 2012. doi:10.4172/2161-1041.S2-001
10. Malik D, David RM, Gooderham NJ. Mechanistic evidence that benzo[a]pyrene promotes an inflammatory microenvironment that drives the metastatic potential of human mammary cells. *Arch Toxicol*. 2018;92(10):3223-3239. doi:10.1007/s00204-018-2291-z
11. Amadou A, Praud D, Coudon T, et al. Risk of breast cancer associated with long-term exposure to benzo[a]pyrene (BaP) air pollution: Evidence from the French E3N cohort study. *Environ Int*. 2021;149:106399. doi:10.1016/j.envint.2021.106399
12. Wang H, Liu B, Chen H, Xu P, Xue H, Yuan J. Dynamic changes of DNA methylation induced by benzo(a)pyrene in cancer. *Genes Environ*. 2023;45(1):21. doi:10.1186/s41021-023-00278-1
13. Guo J, Xu Y, Ji W, Song L, Dai C, Zhan L. Effects of exposure to benzo[a]pyrene on metastasis of breast cancer are mediated through ROS-ERK-MMP9 axis signaling. *Toxicol Lett*. 2015;234(3):201-210. doi:10.1016/j.toxlet.2015.02.016
14. Remelia M, Bela B, Widyaningtyas ST, Antarianto RD, Mazfufah NF, Pawitan JA. The Use of Cell-penetrating Peptide for Delivery of Recombinant Transcription Factor DNA into Primary Human Fibroblast. *Mol Cell Biomed Sci*. 2023;7(1):28. doi:10.21705/mcbs.v7i1.279
15. Karina K, Rosliana I, Rosadi I, et al. Safety of Technique and Procedure of Stromal Vascular Fraction Therapy: From Liposuction to Cell Administration. *Scientifica (Cairo)*. 2020;2020:1-11. doi:10.1155/2020/2863624
16. Rukmana A, Supardi LA, Sjatha F, Nurfadilah M. Responses of Humoral and Cellular Immune Mediators in BALB/c Mice to LipX (PE11) as Seed Tuberculosis Vaccine Candidates. *Genes (Basel)*. 2022;13(11):1954. doi:10.3390/genes13111954
17. Ifana CA, Andriyanto, Pristihadi DN. Uji Toksisitas Akut Sari Buah Apel (Malus domestica) pada Mencit (Mus musculus). *J Vet dan Biomedis*. 2024;2(1):22-28. doi:10.29244/jvetbiomed.2.1.22-28.
18. Nansi EM, Durry MF, Kairupan C. GAMBARAN HISTOPATOLOGIK PAYUDARA MENCIT (Mus musculus) YANG DIINDUKSI BENZO(α)PYRENE DAN DIBERIKAN EKSTRAK KUNYIT (Curcuma longa L.). *J e-Biomedik*. 2015;3(1). doi:10.35790/ebm.3.1.2015.7504
19. Medvec AR, Ecker C, Kong H, et al. Improved Expansion and In Vivo Function of Patient T Cells by a Serum-free Medium. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018;8(March):65-74. doi:10.1016/j.omtm.2017.11.001

20. Wahyuni FS, Putri IN, Arisanti D. Uji Toksisitas Subkronis Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Asam Kandis (Garcinia cowa Roxb.) terhadap Fungsi Hati dan Ginjal Mencit Putih Betina. *J Sains Farm Klin*. 2017;3(2):202. doi:10.29208/jsfk.2017.3.2.126
21. Adryan Fristiohady, Mesi Leorita, Rini Hamsidi, Nur Azizah R, Fransiskus, Wahyuni, La Ode Muhammad Julian Purnama, Baru Sadarun IS. Immunomodulatory Activity of Callyspongia sp. Extract Towards Interferon-gamma (IFN-γ) and Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF-α) Levels in Staphylococcus aureus –Induced Wistar Male Rats. *Biointerface Res Appl Chem*. 2020;11(2):9311-9317. doi:10.33263/BRIAC112.93119317
22. Taha Z, Crupi MJF, Alluqmani N, et al. Syngeneic mouse model of human HER2+ metastatic breast cancer for the evaluation of trastuzumab emtansine combined with oncolytic rhabdovirus. *Front Immunol*. 2023;14. doi:10.3389/fimmu.2023.1181014