

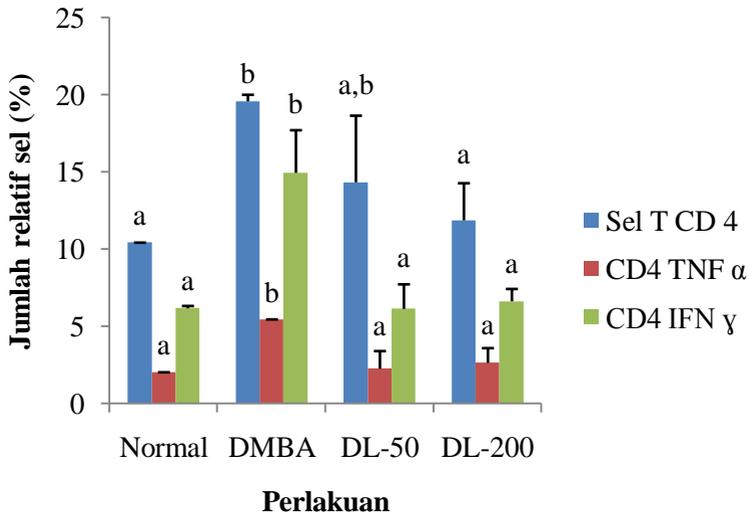
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Ekstrak Lemon terhadap Sitokin Proinflamasi

Sitokin adalah protein sistem imun yang mengatur interaksi antar sel dan dapat memicu reaktivitas imun, baik sistem imun adaptif maupun spesifik. Sitokin dapat membawa pesan kimiawi dan perantara dalam komunikasi antar sel, reseptor yang diekspresikan dan afinitas dari sitokin dapat mempengaruhi respon seluler. Sitokin yang berperan dalam imunitas pada umumnya diproduksi oleh beberapa sel yang bekerja terhadap sel sasaran yang berbeda. Inflamasi merupakan salah satu respon sistem imun terhadap suatu antigen, sistem imun yang berperan terhadap respon proinflamasi adalah sitokin TNF- α dan IFN- γ . Pada studi kali ini adalah untuk mengetahui respon sitokin TNF- α dan IFN- γ yang diproduksi oleh sel T helper (Th) terhadap respon dari sel limfosit sel T CD 4 pada mencit model kanker payudara.

Penelitian ini menggunakan mencit BALB/c betina model kanker payudara dengan injeksi DMBA. Mencit dibagi menjadi kelompok perlakuan normal (N), kanker payudara (D), kanker payudara yang diberi dosis lemon 50 mg/kg dan 200 mg/kg (DL-50 dan DL-200). Analisis penelitian ini menggunakan *flowcytometry* dan didapatkan jumlah sel relatif kemudian hasil tersebut akan dianalisis menggunakan SPSS.

Hasil analisis *flowcytometry* terhadap jumlah relatif sel menunjukkan adanya perbedaan nyata antara mencit normal (N) dan mencit kanker payudara (D). Rata-rata jumlah populasi sel T CD4 pada mencit kanker payudara cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan mencit normal yaitu pada mencit memiliki rata-rata jumlah relatif populasi sel limfosit T CD 4 sebanyak 19,57 % lebih tinggi dibandingkan dengan mencit normal yaitu sebanyak 10,43 %. Pemberian dosis ekstrak lemon pada mencit kanker payudara menunjukkan adanya pengaruh penurunan jumlah sel relatif sel T CD4 ($P \leq 0,05$). Hal tersebut dibuktikan dengan adanya penurunan dari mencit dengan kanker payudara (D) sebesar 19,57 mengalami penurunan pada mencit DL-50 yaitu sebesar 14,33 % dan pada mencit DL-200 mengalami penurunan menjadi 12,44 %.



Gambar 9. Grafik perbandingan jumlah relatif sel limfosit T CD4 dengan sitokin proinflamator TNF- α dan IFN- γ . Perbandingan notasi pada tiap perlakuan menunjukkan kelompok yang berbeda

Hasil penelitian menunjukkan jumlah sitokin sel T CD4⁺ yang mensekresikan TNF- α memiliki perbedaan nyata antara mencit normal (N) dengan mencit model kanker payudara (D) ($P \leq 0,05$) yaitu pada mencit normal sitokin TNF- α yang terekspresi adalah sekitar 2,04 5% sedangkan TNF- α yang terekspresi pada mencit model kanker payudara adalah sekitar 5,43%. Setelah pemberian ekstrak lemon selama enam minggu pada kelompok mencit perlakuan D-50 dan D-200 menunjukkan adanya perubahan ekspresi sitokin TNF- α yang terekspresi oleh CD4. Jumlah relatif sel T CD4⁺ TNF- α ⁺ yang terekspresi pada mencit D-50 adalah sekitar 2,27 % dan pada mencit D-200 adalah 2,65 %. Hasil tersebut menunjukkan bahwa setelah pemberian ekstrak lemon baik dengan dosis 50 mg/kg (DL-50) atau dosis 200 mg/ml (DL-200) ekspresi sitokin CD4⁺ TNF- α ⁺ mengalami penurunan hampir mendekati normal, tetapi masing-masing dosis pada rata-rata mencit perlakuan tidak menunjukkan adanya perbedaan nyata.

Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan nyata jumlah sel T CD4⁺ IFN- γ ⁺ pada mencit normal dan mencit model kanker payudara. Analisis menunjukkan bahwa jumlah relatif sel CD4⁺ IFN- γ ⁺ pada rata-rata mencit model kanker payudara lebih tinggi dibandingkan dengan mencit normal ($P \leq 0,05$). Jumlah relatif sitokin IFN- γ yang terekspresi pada mencit normal adalah 6,18 % pada rata-rata mencit model kanker adalah 14,94 %.

Grafik pada gambar 9 menunjukkan adanya perbedaan rata-rata jumlah sel relatif sel CD4⁺ IFN- γ ⁺ pada kelompok mencit yang diberi ekstrak lemon dengan dosis 50 mg/kg dan 200 mg/kg. Masing-masing kelompok mencit dengan dosis lemon yang berbeda mampu menurunkan sekresi IFN- γ yang dapat terlihat dari rata-rata jumlah relatif sel CD4⁺ IFN- γ ⁺ pada DMBA sebesar 14,94%, sedangkan pada D-50 sebesar 6,14 % dan D-200 sebesar 6,63 % .

Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan jumlah relatif sel T CD4 di mencit model kanker payudara sebesar 9,14 % hal tersebut berkaitan dengan peningkatan sekresi TNF- α dan IFN- γ di mencit model kanker payudara yaitu sebesar 3,39 % dan 8,76%. Pada mencit normal jumlah sekresi sitokin proinflamasi cenderung rendah dibandingkan dengan mencit model kanker payudara, hal tersebut diduga pada mencit normal respon imun yang diperlukan untuk melawan antigen salah satunya berupa respon imun inflamasi oleh sitokin proinflamasi TNF- α dan IFN- γ tidak terlalu dibutuhkan. Jumlah relatif sel T CD4 dan sitokin proinflamasi di mencit model kanker payudara mengalami peningkatan hal tersebut diduga karena terjadi peningkatan respon imun berkaitan dengan meningkatnya aktifitas sel imun terhadap antigen, kanker payudara bertindak sebagai antigen (Criscitiello, 2012). Sel kanker mengekspresikan antigen yang berbeda dengan sel pada umumnya. Antigen tersebut merupakan produk dari gen yang bermutasi (memiliki ekspresi yang berbeda pada gen di sel normal) atau dapat juga ekspresi protein normal yang berlebihan. Ekspresi antigen tersebut berfungsi sebagai pengenalan oleh sistem imun untuk menghasilkan respon imun untuk melawan antigen (Criscitiello, 2012).

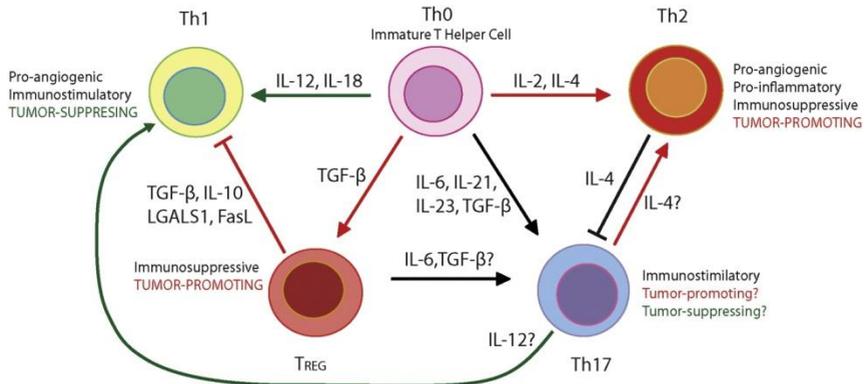
Respon imun memiliki beberapa mekanisme untuk melawan antigen yaitu aktivasi dari sel NK oleh IL2 dan mengaktifkan efektor yang lain sehingga akan berperan sebagai pembunuh sel kanker, memproduksi antibodi pada tumor yang berasosiasi dengan antigen yang akan berikatan dengan antigen sehingga makrofag dan limfosit sitotoksik yang aktif mengenali sel kanker, aktivasi sel T limfosit CD8

menjadi CTLs oleh MHC yang akan memediasi mekanisme penekanan proliferasi sel kanker, dan dengan aktivasi makrofag oleh IFN- γ yang dapat memproduksi TNF-2 dan oksigen intermediet seperti nitrit oksida (Ruddon dkk, 2007).

Respon imun terhadap antigen salah satunya yaitu respon inflamasi. Inflamasi dapat terjadi ketika APC yang teraktivasi oleh antigen asing atau antigen tumor kemudian akan memproduksi sitokin yang dapat meningkatkan respon sel T. Molekul kostimulator APC akan berikatan dengan koreseptor sel T. Ikatan antigen dengan reseptor dapat menyebabkan aktivasi dari protein kinase dan sinyal transduksi menuju nukleus dan mengaktifkan gen yang berfungsi untuk proliferasi dan diferensiasi (Ruddon dkk, 2007).

Respon inflamasi dapat berperan ganda yaitu sebagai antitumor tetapi juga dapat berperan sebagai pro-tumor. Hal tersebut berkaitan dengan sekresi Th1 dan Th2 oleh prekursor sel T CD4 (Th0) (Gambar 10). Jika Th0 berikatan dengan IL-12 maka akan berdiferensiasi menjadi sel Th1 sedangkan jika Th0 diberikan sinyal oleh IL-4 dan IL-13 akan berdiferensiasi menjadi sel Th2. Sitokin yang disekresikan oleh Th1 berasosiasi dengan fungsi sitotoksik sel kanker seperti TNF- α , IFN- γ , IL-2, dan IL-12, secara bersama-sama sitokin tersebut dapat menaikkan kapabilitas sitotoksik oleh makrofag M1, CTL, sel NK, dan sel NKT. Sel Th2 berkaitan dengan respon asma, alergi, dan respon imun helminth. Sel Th2 mengekspresikan sitokin IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, dan IL-13 yang tinggi. Th1 dan Th2 mengsekresikan profil sitokin yang berperan antagonis antara satu dengan yang lainnya. Th1 atau Th2 akan mensekresi sitokin yang dapat menguatkan diferensiasi dan aktivasi dari populasi sel T helper pada fenotipnya sendiri dan dapat menghambat diferensiasi dan aktivasi dari sel T helper yang lain (Burkholder dkk., 2014).

Efek *immunostimulatory* dari Th1 dan M1 dapat menghasilkan inflamasi antitumor dengan sekresi profil sitokin dari sel imun yang masuk ke gel matrik. Sel Th1 dan M1 di lingkungan mikro tumor (*tumor micro environment/* TME) dapat menyebabkan produksi IL-1 α dan IL-1 β oleh M1. Sekresi sitokin oleh sel Th1 juga dapat meningkatkan proliferasi sel B dan produksi antibodi, meningkatkan kapabilitas APC dari DC, bersinergis dengan IL-2 yang akan menstimulasi proliferasi dari sel sitotoksik, meningkatkan proliferasi dan diferensiasi dari sel T efektor CD4, serta meningkatkan sitotoksitas dari sel M1 (Burkholder dkk., 2014; Haabeth dkk., 2012).

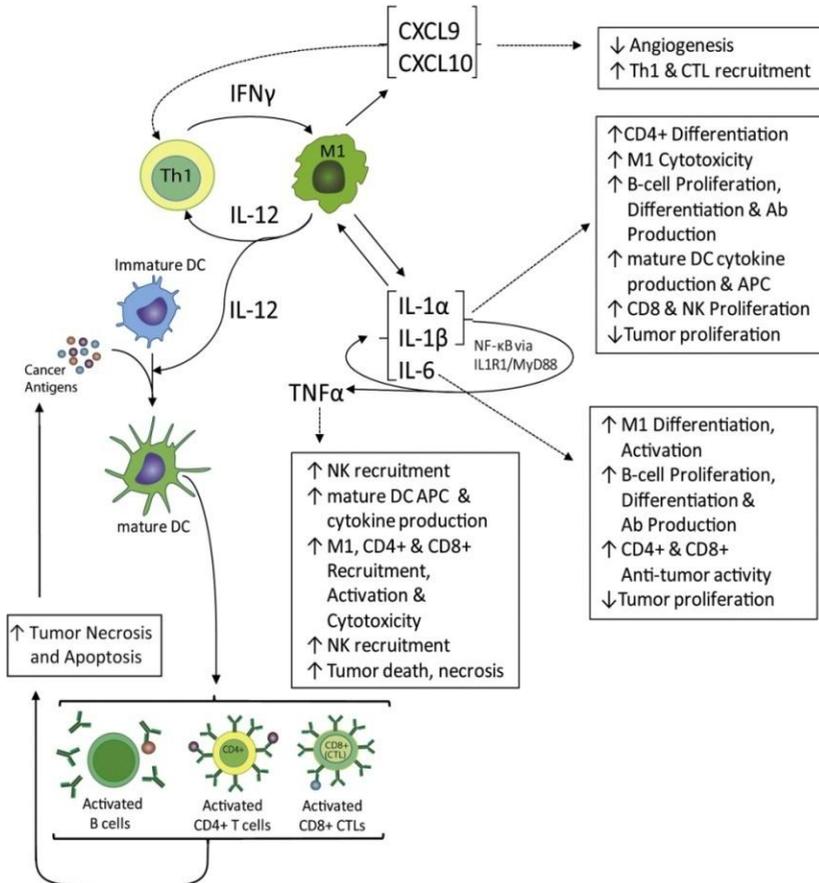


(Burkholder dkk., 2014)

Gambar 10. Diferensiasi sel T *helper*. Sel T *helper* merupakan diferensiasi dari sel T *helper* progenitor *immature* (Th0) dan akan berdiferensiasi menjadi fenotip T *helper* (Th 1 atau Th 2) bergantung pada sitokinya.

Sekresi TNF- α yang cenderung lebih rendah dibandingkan dengan sekresi IFN- γ pada mencit model kanker payudara diduga berkaitan dengan fungsi TNF- α pada kadar yang rendah memiliki efek pada leukosit dan endotel yang dapat menginduksi inflamasi akut sedangkan jika terlalu tinggi dapat menimbulkan kelainan patologik syok septik. Sitokin TNF- α pada kadar yang rendah mampu menginduksi inflamasi sistemik yang mana akan meningkatkan IL-12 yang akan merangsang produksi IFN- γ oleh sel NK atau sel T dan diferensiasi sel T CD4⁺ menjadi sel Th 1 yang memproduksi IFN- γ (Baratawidjaja & Rengganis, 2013).

Sitokin TNF- α berperan pada respon inflamasi akut terhadap bakteri gram negatif dan mikroba lainnya. TNF- α yang teregulasi oleh aktivasi sinyal NF- κ B berfungsi untuk aktivasi dari fungsi APC oleh DC dan aktivasi sitotokin makrofag M1, sel T efektor CD4, dan sel CD8, dan sel NK. Sitokin IFN- γ berperan untuk mengaktifkan makrofag untuk membunuh fagosit, merangsang MHC-I dan MHC-II serta kostimulator APC. Ketika distimulasi oleh IFN- γ dan TNF- α , Th1 efisien dalam program pengistirahatan kanker (Gambar 11). Sitokin IFN- γ yang diproduksi oleh sel Th1 akan menyebabkan diferensiasi dan aktivasi dari fenotip M1-produksi IL-12 yang akan menguatkan fenotip Th 1 (Burkholder dkk., 2014).



(Burkholder dkk., 2014).

Gambar 11. Peran sitokin proinflamasi terhadap antigen kanker. Limfosit Th1 dan makrofag M1 merupakan sumber primer dari sitokin proinflamasi yang dapat mempromosikan *cancer surveillance* dan sitotoksitas. Sekresi dari IFN- γ oleh sel Th1 menghasilkan rekrutmen makrofag M1 dan mengaktifasi dan menginduksi fenotip Th1, merekrut CTLs dan menghambat angiogenesis. Sinyal dari IL-1 dan IL-6 dapat mestimulasi sinyal NF- κ B sehingga akan mensekresi TNF- α yang dapat mengaktifkan fungsi APC dari DCs dan aktivasi makrofag M1, dan rekrutmen sel NK

Sel limfosit Th 1 yang mensekresikan TNF- α dan IFN- γ dapat menghasilkan imunitas adaptif dan humoral. Imunitas adaptif salah satunya adalah dengan diferensiasi menjadi tipe M1 dan mengaktifkan peran APC pada makrofag. Makrofag dengan fenotip M1 dapat membantu respon sistem imun dengan menghasilkan sekresi IL-12, IL-1, TNF- α , dan IFN- γ oleh limfosit sel Th, menginduksi nitrit oksida dan ARG 1 yang dapat meningkatkan sitotoksitas CTL (Burkholder dkk., 2014). Makrofag yang diaktifkan dapat melepaskan berbagai produk diantaranya adalah enzim proteinase dan hidrolase, protein plasma, faktor koagulasi, hasil metabolit, dan regulasi fungsi sel. Makrofag yang mengenali antigen memiliki enzim yang berfungsi sebagai sitotoksik dan menghasilkan nitrit oksida oleh enzim iNOS yang akan mengkonversi arginin menjadi nitrit oksida yang dapat bersifat toksik (Baratawidjaja & Rengganis, 2013).

TNF- α dan IFN- γ diduga dapat menginduksi apoptosis serta diduga dapat berfungsi sebagai regulasi subset Th1 dan berfungsi untuk meningkatkan proliferasi sel B menghasilkan Ig-G yang sebagai imunitas humoral yang akan berikatan dengan antigen dan mengaktifkan fungsi ADCC. Makrofag diduga juga dapat mengikat antigen tumor melalui Ig-G yang mengikat antigen tumor, selanjutnya makrofag dapat memfagositosis, memecah menjadi peptida dan mempresentasikannya ke sel CD4. CD4 yang teraktivasi oleh MHC tipe 2 akan berdiferensiasi menjadi sel T helper 1 dan mulai mensekresi sitokin yang berkaitan dengan respon imun terhadap antigen tumor tersebut diantaranya adalah IFN- γ dan TNF- α (Burkholder dkk., 2014; Baratawidjaja & Rengganis, 2013).

Sel NK dapat mengenali antigen yaitu dengan cara mengenali MHC tipe I yang dihasilkan oleh setiap sel yang memiliki nukleus. Sel NK memiliki inhibitor yang dapat mengaktifkan sifat sitotoksik dari sel NK. Sel NK yang mengenali MHC tipe 1 akan mengaktifkan inhibitor sehingga sel NK tidak menjadi sitotoksik sedangkan jika sel NK tidak mengenali MHC I atau mengenali MHC yang berbeda dapat menyebabkan inhibitor menjadi tidak aktif dan sel NK menjadi aktif. Sel NK yang sitotoksik dapat mensekresi lisosom yang mengandung perforin dan granzim. Perforin dapat melubangi membran sel target dan granzim dapat meningkatkan apoptosis sel. Sel NK yang aktif juga menghasilkan sitokin proinflamasi yaitu sitokin TNF- α dan IFN- γ yang dapat membuat sel B aktif kemudian berdiferensiasi dan menghasilkan IG-g, yang akan mengaktifkan sel NK melalui ADCC (Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity) (Chester dkk., 2015).

ADCC adalah peristiwa antibodi yang berikatan dengan sel sasaran yang kemudian akan dikenali oleh sel pembunuh salah satunya adalah sel NK. Sel NK diduga akan mengenali Ig-G yang berikatan pada sisi FcR yang kemudian akan melepaskan enzim litik terhadap sel sasaran serta dapat menghasilkan sel proinflamasi seperti IFN- γ yang menyebabkan maturasi sel dendritik. Sel dendritik tersebut akan meningkatkan presentasi antigen dan dapat menyebabkan limfosit spesifik tumor akan menghasilkan respon imun dan mendapatkan respon memori. TNF- α diduga dapat meningkatkan proliferasi sel B dan meningkatkan diferensiasi monosit (Chester dkk., 2015).

4.2 Peran Ekstrak Lemon Terhadap Sel Kanker

Setelah diberikan ekstrak lemon setiap hari selama dua minggu telah menyebabkan penurunan sitokin proinflamasi mendekati normal baik pada pemberian dosis 50 mg/kg BB dan 200 mg/kg BB pada mencit model kanker payudara. Penurunan sitokin proinflamasi setelah pemberian ekstrak lemon diduga karena adanya perbaikan dalam tubuh yang dapat menurunkan pertumbuhan sel kanker. Pertumbuhan sel kanker yang semakin berkurang menyebabkan penurunan aktivitas berlebihan pada sel imun. Buah lemon memiliki berbagai macam komponen bioaktif yang diduga memiliki kemampuan untuk menurunkan pertumbuhan sel kanker. Bahan bioaktif yang terdapat dalam buah lemon diantaranya adalah flavonoid, Flavonoid adalah metabolit sekunder tanaman yang memiliki mekanisme untuk melawan kondisi stress biotik dan abiotik (Lopez dkk, 2016).

ROS dapat menimbulkan kerusakan DNA yang dapat menginisiasi pembentukan kanker diantaranya adalah *strand breakbase modification* dan *crosslink DNA* yang dapat menyebabkan mutasi dan transformasi pada beberapa kanker. Antioksidan dapat menurunkan *stress* oksidatif yang dapat menimbulkan karsinogenesis dengan *scavenging* terhadap ROS. Antioksidan memiliki dua mekanisme yaitu dengan *chain breaking mechanism* yaitu antioksidan akan mendonasikan elektron ke radikal bebas dan mekanisme yang kedua adalah dengan menghilangkan ROS (*reactive oxygen spesies*) dengan katalisis. Antioksidan terbagi menjadi enzimatik dan non enzimatik. Antioksidan enzimatik bekerja dengan berinteraksi dengan enzim antioksidan. Antioksidan non enzimatik yang terdapat dalam buah lemon diantaranya adalah vitamin C dan flavonoid (Lobo dkk., 2010; Rahman, 2007).

Vitamin C diduga mampu mereduksi ROS secara langsung dengan menghambat pembentukan nitrosamines, meningkatkan respon imun dan akselerasi dari detoksifikasi dari enzim liver. Flavonoid diduga mempunyai efek antioksidan, modulator aktivitas enzim, dan bekerja sebagai antimutagenik atau sitotoksik dan perlindungan terhadap *stress* oksidatif. Flavonoid dapat sebagai *scavenger* dari radikal peroksid, inhibitor efektif dari peroksidase lipid (Rahman, 2007).

Flavonoid memiliki mekanisme lain dalam penghambatan kanker diantaranya adalah meningkatkan apoptosis, penghambatan proliferasi sel, penghambatan peroksidase lipid, penghambatan angiogenesis, dan penghambatan oksidasi DNA. Mekanisme molekuler sebagai antiproliferasi adalah dengan penghambatan proses prooksidan yang dapat menyebabkan pembentukan tumor. Flavonoid diduga dapat mengistirahatkan siklus sel dengan cara pada saat adanya sinyal mitogenik sel akan memasuki fase regulasi yang diikuti dengan transverse siklus sel dan *cyclin dependent kinase* (CDK) yang dikenal sebagai regulator dari progresi siklus sel. Perubahan atau regulasi kembali CDK berhubungan dengan neoplasia. Pada beberapa jenis kanker dapat berasosiasi dengan peningkatan mutasi dari gen CDK atau gen inhibitor CDK. Flavonoid diduga dapat menginduksi pengistirahan siklus sel pada saat G1 atau G2/ M dengan menghambat CDK (Chahar dkk., 2011).

Apoptosis adalah program kematian sel dengan mengeliminasi sel yang diinginkan atau sel yang mengalami kerusakan. Kanker memiliki mekanisme tersendiri dalam penghambatan program kematian sel. Flavonoid diduga dapat menginduksi apoptosis dengan berbagai cara diantaranya adalah penghambatan aktivitas DNA topoisomerase I dan II, mengurangi ROS, memodulasi jalur sinyal, penurunan regulasi dari NF- κ B, aktivasi dari endonuklease dan penurunan Mcl-1 (Chahar dkk., 2011).

Flavonoid juga memiliki peran untuk menghambat aktivasi metabolik karsinogen dengan interaksi enzim metabolisme seperti P450, enzim tersebut dapat mengaktifkan prokarsinogen menjadi reaktif. Flavonoid menghambat aktifitas dari isoenzim P450 seperti CYP1A1 dan CYP1A2 sehingga diharapkan dapat menghambat adanya kerusakan seluler atau dapat menginduksi enzim metabolisme seperti GST, quinone reduktase sehingga karsinogen terdetoksifikasi dan tereliminasi dari tubuh (Chahar dkk., 2011).