

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Kanker Payudara**

Kanker merupakan penyakit seluler yang dapat disebabkan oleh ketidaknormalan dari pembelahan sel. Penggunaan bahan kimia dan lingkungan berpengaruh dalam perubahan DNA pada sel normal. Zat-zat yang menyebabkan terjadinya perubahan atau mutasi DNA dikenal sebagai mutagen, dan mutagen yang menyebabkan kanker disebut karsinogen. Karsinogenesis melibatkan pertumbuhan sel yang tidak terkendali, aktivasi onkogen dan deaktivasi gen penekan tumor. Perkembangan sel tumor melibatkan serangkaian peristiwa yaitu disregulasi pada diferensiasi selular, proliferasi berlebihan dan resistensi sel untuk apoptosis (Hejmadi, 2010). Pencegahan kanker dengan senyawa fitokimia merupakan salah satu pendekatan yang dapat dilakukan. Kemoprevensi sebagai agen alami farmakologis mampu menghambat perkembangan sel kanker dengan menghalangi terjadinya kerusakan DNA (Minari dkk., 2015).

Kanker disebabkan karena beberapa faktor, salah satunya yaitu radiasi, bahan kimia, dan adanya infeksi. Hal-hal tersebut dapat menyebabkan terjadinya mutasi DNA. Hampir 20 % dari jumlah kasus kanker di seluruh dunia disebabkan oleh infeksi, baik infeksi dari virus, bakteri maupun mikroorganisme lainnya. Pada beberapa negara berkembang angka jumlah penderita kanker semakin meningkat. Sementara penularan virus antar individu merupakan faktor utama, kondisi gaya hidup, sanitasi lingkungan juga berperan dalam penyebab kanker. Adanya infeksi kronis dalam tubuh cenderung menurunkan efisiensi sistem kekebalan tubuh (Hesketh, 2013).

Gejala awal dari kanker payudara susah dikenali karena tidak menimbulkan gejala yang bermakna. Sebuah benjolan kecil tidak terlalu nampak untuk merasakan adanya perubahan yang tidak biasa pada payudara. Kanker payudara dapat diketahui dengan mengambil sampel dari jaringan pada payudara yang mengalami benjolan untuk diuji secara histologi. Cara tersebut mampu untuk mengetahui jenis pertumbuhan sel yang terjadi, apakah tumor bersifat jinak atau ganas (American Cancer Society, 2015).

Beberapa kasus, tanda awal dari penyakit kanker payudara adalah adanya benjolan pada daerah payudara. Sebuah benjolan yang tidak menyakitkan, keras, dan memiliki tepi yang tidak rata. Tanda-tanda

gejala kanker payudara yang dapat diamati yaitu pembengkakan pada seluruh atau sebagian payudara, iritasi kulit payudara, nyeri payudara, nyeri puting atau puting berbalik tertarik ke arah dalam, kemerahan atau penebalan puting payudara dan puting mengeluarkan cairan selain air susu (American Cancer Society, 2015).

## **2.2 Data Endemik Kanker Payudara**

Jumlah penderita kanker semakin meningkat dari 12,7 juta pada tahun 2008 menjadi 14,1 juta pada tahun 2012. Kematian akibat kanker juga mengalami peningkatan dari 7,6 juta pada tahun 2008 menjadi 8,2 juta pada tahun 2012. Berdasarkan data tersebut, kanker merupakan penyebab kematian nomor dua di dunia setelah penyakit kardiovaskular. Indonesia, tepatnya di Provinsi Bali merupakan provinsi dengan jumlah penderita kanker tertinggi ketiga setelah Yogyakarta dan Jawa Tengah. Apabila ditinjau dari jenis kelamin penderita kanker di Indonesia, perempuan yang mengalami kanker lebih banyak daripada laki-laki yaitu sebesar 2,2 per 1000 penduduk dan laki-laki sebesar 0,6 per 1000 penduduk. Pada tahun 2012 kanker payudara adalah kasus kanker dengan presentase tertinggi yaitu 43,3 % dan juga merupakan kanker dengan presentase kematian tertinggi yaitu 12,9 % pada perempuan di dunia (KEMENKES RI, 2015).

Kanker merupakan salah satu penyakit penyebab kematian utama di seluruh dunia. Pada tahun 2012, terdapat sekitar 8,2 juta masyarakat dunia yang mengalami kematian disebabkan oleh kanker. Lebih dari 30 % kematian akibat kanker disebabkan oleh lima faktor berikut yaitu: indeks massa tubuh tinggi, kurang mengonsumsi buah-buahan dan sayuran, kurang aktivitas fisik, penggunaan rokok dan konsumsi alkohol berlebihan. Merokok merupakan salah satu faktor penyebab kanker yang menyebabkan lebih dari 20 % kematian di seluruh dunia karena sekitar 70 % kematian di seluruh dunia diakibatkan oleh kanker paru-paru. Kasus kanker pada setiap tahun diperkirakan akan selalu mengalami peningkatan dari 14 juta pada 2012 menjadi 22 juta dalam dua dekade berikutnya (KEMENKES RI, 2015).

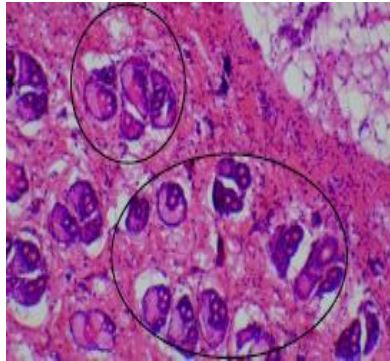
## **2.3 DMBA (7,12-Dimethylbenz[A]Anthracene)**

Salah satu senyawa kimia yaitu 7,12-dimetilbenz[a]antrasena atau DMBA merupakan senyawa kimia yang bersifat karsinogen. DMBA umumnya digunakan di laboratorium untuk penelitian yang mempelajari

kanker. DMBA memiliki fungsi sebagai inisiator tumor sehingga dengan pemberian DMBA akan mempercepat pertumbuhan tumor (Minari dkk., 2015).



a.



b.

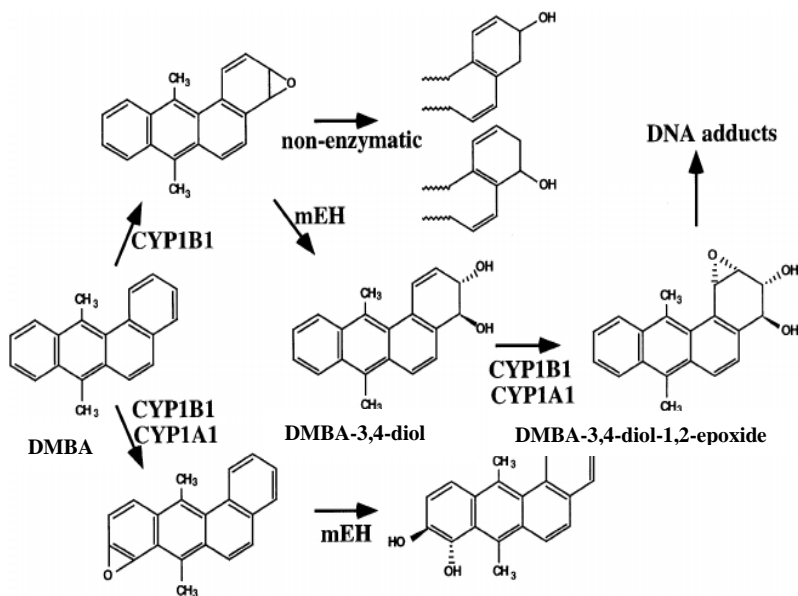
(Minari dkk., 2015)

Gambar 1. Kanker pada mencit akibat induksi DMBA. Keterangan: (a) secara morfologi, (b) secara histologi

Proses karsinogenesis merupakan proses terjadinya kanker yang diawali dengan adanya kerusakan DNA atau mutasi pada gen-gen pengatur pertumbuhan, seperti gen p53 dan gen K-ras. Mutasi tersebut disebabkan karena adanya paparan senyawa karsinogen seperti senyawa golongan Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH) seperti DMBA yang metabolit aktifnya dapat berikatan dengan DNA (Rundle dkk., 2000). DMBA merupakan karsinogen yang berpotensi memicu timbulnya kanker payudara tikus. DMBA juga mengalami aktivasi di hepar dengan proses oksidasi sehingga membentuk karsinogen aktif yang dapat bereaksi dengan DNA. Karsinogenesis yang disebabkan oleh DMBA dapat menyebabkan mutasi pada gen K-ras dan dapat memicu proliferasi sel (Dandekar dkk., 1986).

Menurut Gonzales & Shioko (2001), senyawa DMBA dalam tubuh hewan pengerat akan berikatan dengan sitokrom P-450 dan membentuk ikatan kovalen dengan DNA sel yang aktif sehingga menyebabkan terjadinya adduksi DNA. Adanya ikatan dengan sitokrom P-450 memicu terjadinya detoksifikasi sehingga dapat menyebabkan radikal

bebas. Senyawa aktif dari DMBA yang dapat menyebabkan terjadinya adduksi DNA adalah DMBA 3,4-diol-1,2-epoxide (Gambar 2). Senyawa aktif DMBA tersebut merupakan penentu mutasi pada gen yang berfungsi mengendalikan siklus sel. Senyawa DMBA memiliki interaksi langsung dengan DNA dan ROS yang menyebabkan kerusakan oksidatif seluler dan peroksidasi lipid. Ketidaknormalan siklus sel berdampak pada pembelahan sel yang tidak terkontrol sehingga menyebabkan sel menjadi kanker.



(Gonzales & Shioko, 2001)

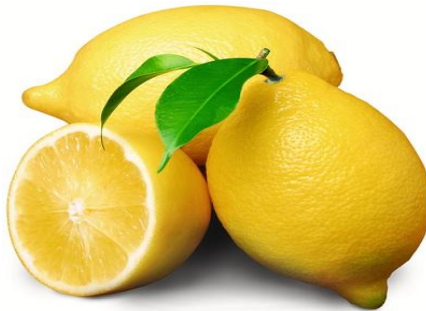
Gambar 2. Proses metabolisme senyawa DMBA dalam menginduksi karsinogenesis

## 2.4 Buah Lemon (*Citrus limon*)

Buah lemon dibudidayakan untuk memperoleh kandungan senyawa yang bersifat antikanker dan antibakteri. Senyawa flavonoid dari tanaman *Citrus* memiliki aktivitas biologis yang tinggi sebagai antibakteri, antijamur, antikanker dan antiviral. Flavonoid berfungsi

sebagai antioksidan dan penangkal radikal bebas yang memiliki kapasitas memodulasi aktivitas enzim dan menghambat proliferasi sel. Kulit buah jeruk (*Citrus* sp) merupakan sumber yang kaya akan flavonoid, glikosida, kumarin dan minyak atsiri. Serat dari buah *Citrus* sp juga mengandung senyawa bioaktif seperti polifenol yang menjadi vitamin C atau asam askorbat dan penting dalam mencegah dan menyembuhkan kondisi kekurangan vitamin C. Kandungan minyak yang diekstraksi dari kulit buah lemon umumnya digunakan sebagai minuman ringan berkonsentrasi, minyak tubuh, kosmetik, minyak rambut, pasta gigi, sabun toilet, sabun kecantikan, desinfektan dan produk lainnya (Mohanapriya dkk., 2013). Menurut Natural Resources Conservation Service (2016), lemon diklasifikasikan sebagai berikut:

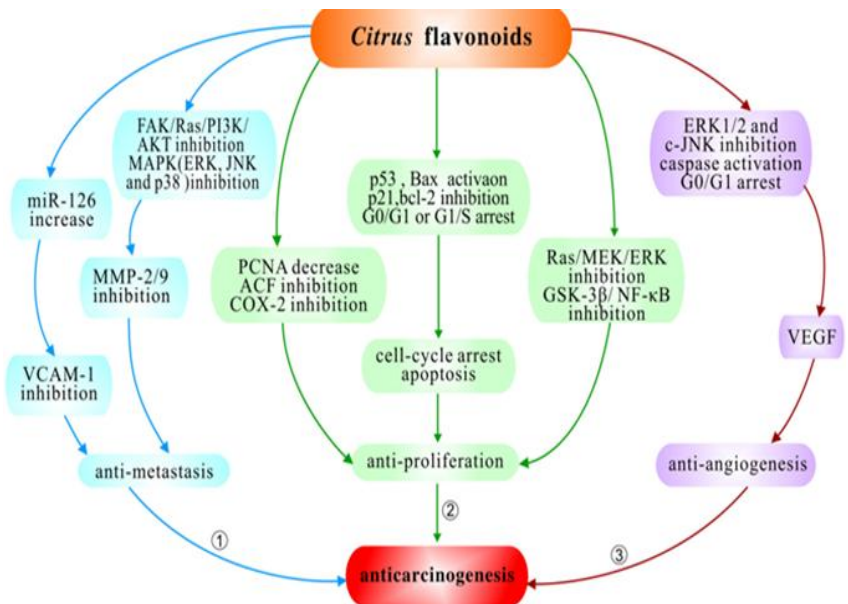
Kingdom : Plantae  
Subkingdom : Tracheobionta  
Superdivisi : Spermatophyta  
Divisi : Magnoliophyta  
Kelas : Magnoliopsida  
Subkelas : Rosidae  
Ordo : Sapindales  
Famili : Rutaceae  
Genus : *Citrus*  
Spesies : *Citrus limon*



(Natureshealth, 2016)

Gambar 3. Buah lemon (*Citrus limon*)

Kulit buah menjadi sumber yang berharga untuk menjaga kesehatan manusia. Kulit buah mengandung senyawa antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan bagian buah lainnya. Senyawa bioaktif alami dalam buah-buahan seperti karotenoid, kuersetin, asam fenolik dan saponin ditemukan dalam jumlah konsentrasi yang lebih tinggi di bagian kulit buah daripada daging buah. Studi terbaru menegaskan bahwa jumlah senyawa fenolik dan asam askorbat lebih tinggi pada kulit buah daripada daging buah. Pentingnya senyawa bioaktif alami menyebabkan perkembangan potensial untuk sumber daya alam di bidang farmasi dan produk makanan. Senyawa polifenol dalam tanaman dianggap sebagai pertahanan dari radikal alam bebas sehingga bermanfaat bagi kesehatan manusia. Senyawa ini juga berperan sebagai antioksidan, antitumor dan antimikroba (El Zawawy & Ahmed, 2015).



(Zunli dkk., 2015)

Gambar 4. Peran senyawa flavonoid pada buah *Citrus* sp sebagai antikarsinogenik

Flavonoid adalah jenis senyawa polifenol yang memiliki struktur terdiri dengan dua cincin aromatik terikat bersama tiga atom karbon yang membentuk heterosiklik oksigen. Flavonoid dapat menghambat reaksi kunci yang dikatalisasi oleh enzim fosfolipase A<sub>2</sub>, cyclooxygenase (COX) dan lipoksigenase dalam respon inflamasi. Enzim ini terlibat dalam sintesis turunan proinflamasi derivat asam arakidonat (AADs), seperti prostaglandin E<sub>2</sub>, F<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>) dan tromboxane. AADs penting untuk mengaktifkan neutrofil dan merangsang pembentukan ROS di jaringan inflamasi. Flavonoid pada *Citrus* mampu mempengaruhi aktivasi dari sejumlah sel yang terlibat dalam respon imun, termasuk sel limfosit T dan limfosit B. Dilaporkan bahwa pemberian secara oral flavonoid *Citrus* dapat meringankan penyakit hati alkoholik dengan cara mencegah pembentukan lipid yang berlebihan dan menekan induksi inflamasi di hepatosit. Beberapa uji klinis juga menunjukkan efek positif dari flavonoid *Citrus* dalam pengurangan sitokin proinflamasi pada manusia (Gambar 4) (Zunli dkk., 2015).

## 2.5 Sistem Imunitas

Sistem imunitas merupakan kumpulan organ kompleks yang berperan dalam pertahanan tubuh terhadap infeksi atau benda asing yang masuk ke dalam tubuh sebagai antigen. Sel-sel imunitas dapat ditemukan pada organ-organ limfoid. Pada organ limfoid terjadi interaksi antara sel-sel limfosit dengan sel-sel non-limfosit. Organ limfoid terdiri dari organ limfoid primer dan organ limfoid sekunder. Sel-sel limfosit dihasilkan oleh organ limfoid primer yang pada gilirannya akan menuju ke organ limfoid sekunder. Pada organ limfoid sekunder sel-sel limfosit dijaga untuk tetap hidup dan mengalami adaptasi akibat adanya antigen yang masuk ke dalam tubuh. Organ limfoid primer adalah sumsum tulang dan timus, sedangkan organ limfoid sekunder di antaranya adalah spleen, lymph node, Peyer's patch, appendix, adenoid, dan tonsil (Elaine, 2010).

Menurut Elaine (2010), terdapat dua jaringan limfoid primer yaitu thymus dan sumsum tulang belakang. Thymus merupakan organ yang terletak dalam mediastinum di depan pembuluh-pembuluh darah besar yang meninggalkan jantung. Limfosit yang terbentuk mengalami proliferasi tetapi sebagian akan mengalami kematian, sel limfosit yang hidup akan masuk ke dalam peredaran darah sampai ke organ limfoid sekunder dan mengalami diferensiasi menjadi sel limfosit T. Sel limfosit

ini akan mampu mengadakan reaksi imunologis humoral. Sumsum tulang terdapat pada sternum, vertebra, tulang iliaka, dan tulang iga.

Organ limfoid sekunder diantaranya yaitu *lymph node*, limpa dan GALT. *Lymph node* tersebar dalam tubuh sebagai titik simpul dari sistem pembuluh limpa. Cairan limpa merupakan cairan ekstraseluler yang secara kontinyu diatur keberadaannya dalam tubuh. Cairan tersebut membawa antigen dari jaringan yang terinfeksi dan juga APC yang telah membawa berbagai macam antigen (Rifa'i, 2010). Limpa terletak di belakang lambung. Organ ini bertugas mengumpulkan antigen dari darah dan juga mengumpulkan serta menghancurkan sel darah merah yang telah kehilangan fungsi (Rifa'i, 2010). GALT adalah organ limfoid mencakup adenoid, tonsils, appendix, dan Peyer's patches pada usus halus. GALT ini mempunyai peran mengumpulkan antigen yang berasal dari daerah pencernaan. Pada Payer's patches, antigen dikumpulkan oleh sel epitel khusus yang disebut *multi-fenestrated* atau sel M. Limfosit membentuk folikel tersusun atas sel B yang sangat rapat yang dikelilingi oleh sedikit sel T. *Lymph node*, *spleen*, dan limfoid mukosa berperan dalam mengumpulkan antigen dari daerah infeksi yang selanjutnya akan dikenali oleh sel-sel limfosit untuk dimulainya respon imunitas adaptif (Rifa'i, 2010).

Sistem imunitas dibagi menjadi dua yaitu sistem imunitas non spesifik (*innate*) dan sistem imunitas spesifik (adaptif). Sistem imunitas *innate* terdiri dari sel dendritik, sel makrofag dan sel-sel granulosit. Sistem imunitas *innate* mampu mencegah dan membunuh masuknya bakteri dan benda asing lainnya yang masuk sebagai antigen. Sistem imunitas adaptif berasal dari sel limfosit T dan sel limfosit B (Baratawidjaja & Iris, 2013).

## 2.6 CD68

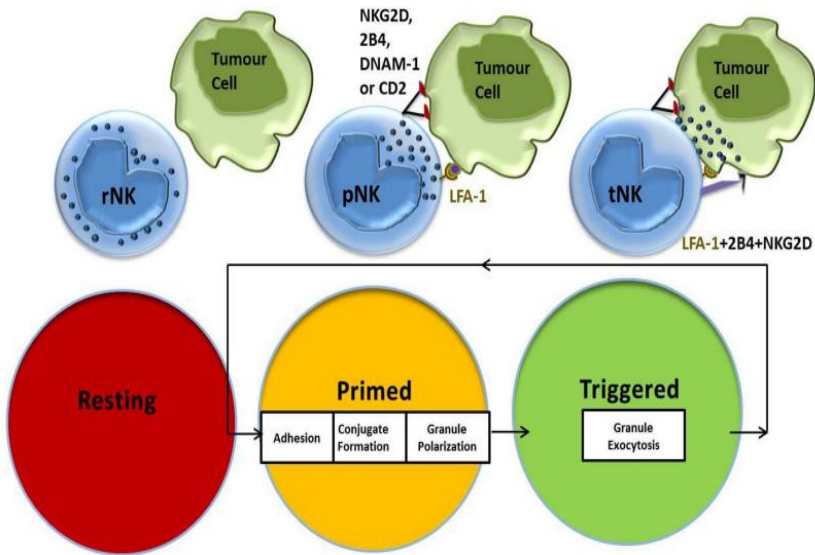
CD68 merupakan glikoprotein dengan berat 110 kDa yang diekspresikan oleh monosit dan makrofag termasuk sel Kupffer, mikroglia, histiosit dan osteoklas. CD68 berperan dalam proses seluler seperti, fagositosis, metabolisme lisosomal, rekrutmen dan aktivasi makrofag. CD68 juga merupakan anggota dari *Lysosomal Associated Membrane Protein* (LAMP), dimana CD68 melokalisasi lisosom dan endosom dengan fraksi yang lebih kecil yang bersirkulasi ke permukaan sel (BioRad, 2016). CD68 dikode oleh beberapa gen yang terdiri dari 6 akson dengan promotor yang berperan untuk spesifitas makrofag dengan tempat pengikatan *Interferon Regulatory Factor* (IRF). Peningkatan sel



CD68 berkorelasi dengan peningkatan angiogenesis dan peningkatan resiko metastasis sel kanker (Medrek dkk., 2012).

### 2.7 Sel Natural Killer (NK)

*Natural Killer* merupakan golongan sel limfosit ketiga setelah sel limfosit T dan sel limfosit B. Pada limfosit, jumlah sel NK sekitar 5 – 15 % dalam sirkulasi dan 45 % dari limfosit dalam jaringan. Sel NK memiliki kemampuan dalam membunuh berbagai sel. Ciri-ciri dari sel NK yaitu memiliki banyak sitoplasma, granula sitoplasma azurofilik, pseudopodia dan nukleus eksentris (Baratawidjaja & Iris, 2013).



(Sabry & Mark, 2013)

Gambar 5. Tahap aktivasi sel NK

Sel NK membunuh sel-sel yang terinfeksi tetapi tidak membunuh sel yang normal. Sel NK mampu mengenali MHC-1 yang diekspresikan oleh semua sel sehat dan tidak oleh sel terinfeksi virus dan kanker. Reseptor yang diaktifkan akan mengenali struktur pada sel sasaran

sehingga sel NK dapat membunuh sel-sel tersebut seperti sel tumor. Ikatan yang terjadi antara reseptor dengan sel NK akan memacu produksi sitokin yang meningkatkan kemampuan migrasi dari sel NK ke tempat yang terinfeksi dan membunuh sel sasaran. Sel NK memproduksi sitokin proinflamasi poten yaitu IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$  serta dapat merangsang pematangan sel dendritik. IFN- $\gamma$  mampu berperan pula dalam mediator aktivasi makrofag dan regulasi perkembangan Th, sehingga sel NK berkorelasi dengan imunitas spesifik (Baratawidjaja & Iris, 2013).

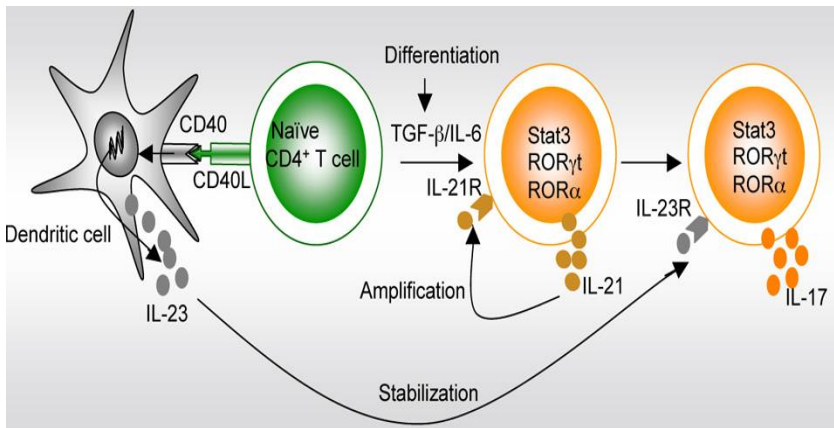
Sel NK memerlukan sinyal awal yang disampaikan oleh sitokin pengaktivasi atau sel target yang mengekspresikan ligan yang diperlukan untuk menginduksi adhesi, pembentukan konjugasi, dan polarisasi granul. Aktivasi sel NK oleh reseptor ligan memediasi sitotoksitas sel NK terhadap sel target. Ikatan antara *Lymphocyte Function-Associated Antigen* (LFA)-1 dengan salah satu reseptor pengaktivasi yaitu, kelompok NK 2 membran D (NKG2D), DNAM-1, 2B4 atau CD2 berperan dalam proses adhesi, pembentukan konjugasi, dan polarisasi granul pada sel NK (Gambar 5). Setelah sel NK membunuh sel target seperti sel tumor tercapai, maka sel NK mampu mengulang siklus aktivasi tersebut dengan pertemuan sel target berikutnya (Sabry & Mark, 2013).

## **2.8 Sel Granulosit (Gr)**

Sel granulosit merupakan sel darah putih yang ditandai dengan adanya granula dalam sitoplasma. Sel granulosit terdiri dari tiga macam yaitu neutrofil, eosinofil dan basofil. Neutrofil berperan sebagai sistem imunitas *innate* terpenting dan sebagai pertahanan infeksi parasit. Eusinofil berperan dalam melawan inflamasi dan alergi. Basofil merupakan sel yang memiliki kemampuan lama terhadap aktivitas fagositosis. Sel-sel granulosit ini memiliki kemampuan bermigrasi ke daerah yang mengalami infeksi atau inflamasi, sehingga sel granulosit meningkat seiring dengan adanya reaksi dari sistem imun (Rifa'i, 2010). Granulosit adalah sel pertahanan utama sistem kekebalan tubuh terhadap infeksi bakteri dan jamur. Transfusi granulosit dianggap sebagai modal terapeutik untuk infeksi bakteri dan jamur pada pasien yang mengalami gangguan fungsional dari neutrofil. Bukti teoritis dan eksperimental yang baik menunjukkan bahwa transfusi granulosit dapat mencegah dan mengobati infeksi berat (Beth dkk., 2013).

## 2.9 IL-17

IL-17 merupakan salah satu dari sitokin proinflamasi. IL-17 terdiri dari enam macam sitokin yaitu IL-17A hingga IL-17F. IL-17 disekresikan oleh sel T helper (Th17) dan sel limfosit bawaan seperti sel NK. Reseptor IL-17 yaitu NF- $\kappa$ B aktivator 1 (Act1) dan TNF Reseptor Faktor (TRAF) adalah protein adaptor yang mengirimkan sinyal kaskade intraseluler untuk mengaktifkan faktor transkripsi seperti NF- $\kappa$ B dan protein aktivator (AP) 1 dalam sel dan jaringan. IL-17 mampu menginduksi pertumbuhan tumor, angiogenesis dan mengekspresikan kemokin tertentu yang mengarahkan sel imun migrasi ke tempat terjadinya inflamasi (Welte & Xiang, 2015).



(Murugaiyan & Bhaskar, 2009)

Gambar 6. Diferensiasi dan stabilisasi sel Th17

Sel T CD4<sup>+</sup> naif akan diaktifkan oleh TGF- $\beta$  dan IL-6. Diferensiasi sel Th17 yang mensekresi IL-17 membutuhkan ekspresi dari faktor transkripsi ROR- $\gamma$ t, dimana ROR adalah reseptor retinoik. Induksi ROR- $\gamma$ t tergantung pada STAT-3 yang diaktifkan oleh IL-6, IL-21 dan IL-23. Kekurangan jumlah STAT-3 dapat mengganggu diferensiasi sel Th17, sedangkan jika berlebihan akan meningkatkan produksi sitokin IL-17. STAT-3 mempengaruhi ekspresi ROR- $\gamma$ t dan berikatan dengan IL-17 serta promotor IL-21. Dengan demikian, STAT-3 dan ROR- $\gamma$ t

mampu mengatur produksi IL-17 secara terkoordinasi (Gambar 6) (Murugaiyan & Bhaskar, 2009). IL-17 mendukung pertumbuhan tumor dengan merangsang angiogenesis kanker dan sel fibrosarkoma. IL-17 juga meningkatkan kapasitas invasif dari sel koriokarsinoma (Zhu dkk., 2008).

## **2.10 Flowcytometry**

*Flowcytometry* merupakan metode pengukuran jumlah dan sifat sel dalam suatu aliran cairan melalui celah sempit yang ditembus oleh sinar laser. *Flowcytometer* merupakan alat yang digunakan untuk membedakan sel atau partikel berdasarkan sinar yang berpendar dan mengukur beberapa karakteristik sel. Prinsip kerja alat ini menggunakan teknik *flowcytometry* yaitu penggunaan *scatter* sinar dari sel yang dialirkan satu per satu melalui sinar laser yang kemudian diamplifikasi dan dikonversikan menjadi sinyal digital serta dapat diplot membentuk *scattergram*. Selain itu, sel atau partikel lain dapat juga dianalisis menggunakan teknik fluoresensi yang dihasilkan dari sel yang berlabel fluorokrom (Brown & Wittmer, 2000).