

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

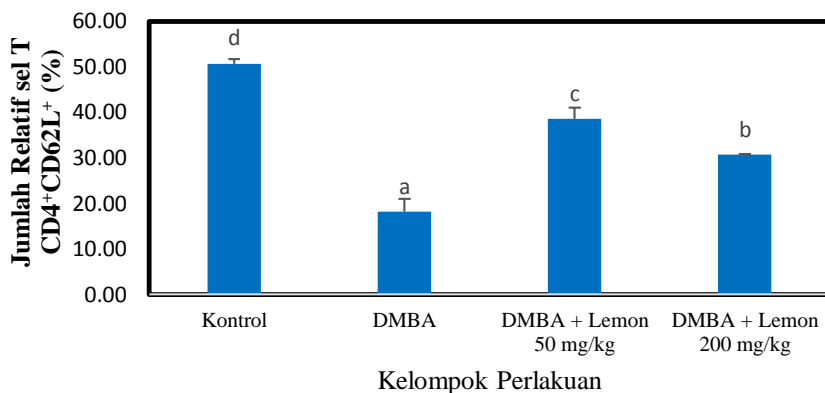
Berdasarkan hasil pemeriksaan secara histopatologi pada mencit perlakuan DMBA menunjukkan bahwa mencit tersebut telah menderita kanker payudara. Hal ini didasarkan pada pengamatan preparat yang menunjukkan adanya sel tumor di bagian *ductal* yang berkembang secara *invasive* ke bagian luar lapisan epitelium *ductal*. Menurut Winchester (2006) menjelaskan bahwa salah satu jenis karsinoma pada kelenjar *mammae* ialah ditandai ketika sel tumor berkembang dan membelah lapisan luar atau membran pembatas bagian *ductal* sehingga sel-sel kanker dapat berkembang di bagian dalam dan luar *ductal*. Adanya sel tumor dalam kelenjar *mammae* mencit, sistem imun akan merespon sel tumor tersebut sebagai antigen. Antigen tumor merupakan sel tumor yang mengekspresikan suatu molekul yang dapat dikenali oleh sel B atau sel T sebagai benda asing.

### 4.1. Analisis Jumlah Relatif Sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>

Makrofag yang memfagositosis dan mempresentasikan imunogen yang berasal dari sel-sel tumor yang mati akan bertindak sebagai APC yang mengekspresikan molekul MHC kelas II. kemudian makrofag membentuk kompleks dengan Sel T CD4 melalui TCR sehingga sel T CD4 akan teraktivasi (Abbas dkk., 2005). Makrofag tersebut akan mensekresi IL-1 yang dapat menstimulasi sel T CD4 mensekresikan IL-2. IL-2 akan memicu proliferasi sel T CD4. Sel T CD4 yang teraktivasi juga akan menginduksi berbagai sel lain seperti sel B, makrofag, prekursor sel T sitotoksik dan sel endothelial melalui limfokin yang disekresikan (Goodman, 1998). Terjadinya aktivasi sel T CD4 tersebut menyebabkan sel T CD4 kehilangan molekul CD62L sebagai marker *homing* dari sel T.

Hasil analisis jumlah sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> menggunakan *flow cytometry* menunjukkan bahwa adanya penurunan secara signifikan jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> atau sel T CD4 naïve pada mencit perlakuan DMBA sebesar 18,13 % dibandingkan dengan mencit perlakuan normal sebesar 50,67 % (Gambar 7). Penurunan jumlah sel T CD4 naïve pada mencit perlakuan DMBA menandakan adanya respon imun secara seluler pada mencit model kanker payudara. Respon imun yang terjadi karena adanya aktivasi sel T CD4, selanjutnya sel T CD4 akan mensekresikan beberapa limfokin yang mampu menginduksi sel-sel imunokompeten lainnya. Hal ini didukung oleh penelitian Huang, dkk. (2015) yang memamparkan bahwa terjadi peningkatan secara signifikan

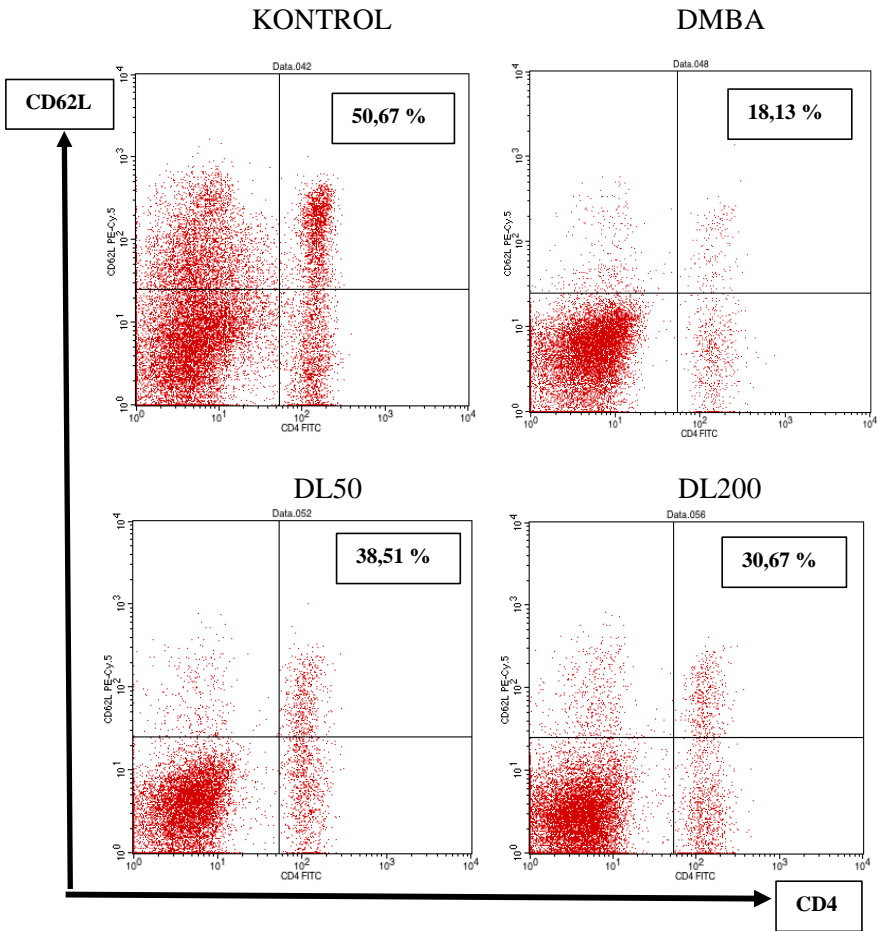
jumlah sel T CD4 yang teraktivasi pada mencit yang diinjeksi secara subkutan dengan *Breast Tumor Cell lines* 4T1 dan E0771 pada bagian jaringan lemak payudara. Sel Th1 merupakan populasi dominan dari sel T CD4 pada tahap awal perkembangan tumor payudara yang kemungkinan berperan penting dalam *immunosurveillance*. Namun, pada tahap akhir kanker payudara populasi dominan sel T CD4<sup>+</sup> berubah menjadi sel Treg dan sel Th17 dalam perkembangan sel tumor.



Gambar 7. Jumlah relatif Sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> (sel T naïve). Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Tukey

Pemberian ekstrak lemon pasca induksi DMBA mampu meningkatkan secara signifikan jumlah relatif sel T CD4 naïve. Jumlah relatif sel T CD4 naïve pada pemberian ekstrak lemon dosis 50 mg/kg BB sebesar 38,51 % lebih tinggi dibandingkan pada pemberian ekstrak lemon dosis 200 mg/kg BB yaitu sebesar 30,67 % dapat dilihat pada (Gambar 8). Jumlah relatif sel T CD4 naïve pada semua perlakuan menunjukkan adanya beda nyata dapat dilihat pada (Gambar 7). Peningkatan jumlah sel T CD4 naïve tersebut mengindikasikan bahwa senyawa yang terkandung dalam ekstrak lemon bersifat imunostimulan. Hal ini diduga kandungan senyawa flavonoid pada ekstrak lemon. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Amorim dkk., (2016) memaparkan bahwa ekstrak *Citrus limon* mampu mengurangi sitokin pro inflamasi TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  dan IFN- $\gamma$

pada mencit yang diinjeksi senyawa karsinogenik. Menurut Devaraj dkk. (2011) Beberapa uji klinis yang pernah dilakukan juga menunjukkan efek positif dari flavonoid pada *Citrus limon* dalam pengurangan sitokin proinflamasi pada manusia. Selain itu senyawa flavonoid juga bersifat mitogen yang mampu menginduksi sintesis IL-2. IL-2 akan menstimulasi proliferasi sel T.



Gambar 8. Rata-rata jumlah relatif sel TCD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> hasil analisis menggunakan software BD Cellquest Pro™

Sel T CD4<sup>+</sup> memiliki peran jangka panjang dalam respon sistem imun melalui aktivasi beberapa sitokin seperti IL-1, IL-2 dan IFN- $\gamma$  yang mampu merangsang pematangan sel T sitotoksik (sel T CD8<sup>+</sup>) (Peters dkk., 2003). IFN- $\gamma$  akan menginduksi sel NK dan sel T untuk mengaktifasi TRAIL yang memberikan sinyal kematian sel kanker secara apoptosis melalui caspase (Pindborg, 2000). selain itu sel T CD4 juga berkontribusi dalam membantu infiltrasi sel T CD8 ke lokasi tumor (Koido dkk., 2010). Sel T CD4 yang telah mengenali antigen (sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) akan berdeferensiasi menjadi sel Th1 atau Th2 bergantung pada jenis antigennya. Sel T helper akan berinteraksi dengan sel tumor sebagai sel efektor. Sel Th1 akan mensekresikan sitokin tipe I yaitu IL-2 dan IFN- $\gamma$ . Hasil sekresi sitokin tersebut akan menstimulasi kerja sel T sitotoksik (sel T CD8) sebagai sel memori. Sedangkan sel Th2 akan mensekresikan sitokin tipe II seperti IL-4 dan IL-10. Sel Th2 dapat meningkatkan imunitas humoral melalui kerja antibodi (Bailey dkk., 2014).

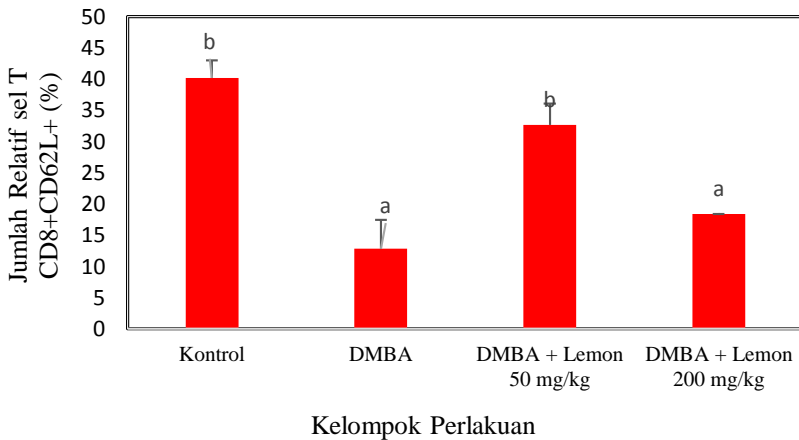
#### **4.2 Analisis Jumlah Relatif Sel T CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>**

Antigen tumor pada kasus kanker sebagian besar dipresentasikan melalui *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas I yang akan membentuk kompleks melalui *T-cell Receptor* (TCR) dengan sel T CD8 (sel T sitotoksik). Hal ini akan mengaktifasi sel T sitotoksik untuk menghancurkan sel tumor tersebut. Sel T CD8 dapat menghancurkan tumor secara langsung melalui efektor seperti granzyme B dan perforin (Koido dkk., 2010). Hasil analisis jumlah sel T CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> menggunakan *flow cytometry* menunjukkan adanya penurunan secara signifikan jumlah relatif sel T CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> atau sel T CD8 naïve pada mencit perlakuan DMBA sebesar 12,81 % dibandingkan dengan mencit perlakuan normal sebesar 40,17 % dapat dilihat pada (Gambar 9).

Penurunan jumlah sel T CD8 naïve pada mencit perlakuan DMBA menandakan adanya respon imun secara seluler pada mencit model kanker payudara. Respon imun yang terjadi karena adanya aktivasi sel T CD8 yang membentuk kompleks melalui TCR dengan MHC kelas I pada permukaan seluler antigen tumor, selanjutnya sel T CD8 akan menghancurkan sel tumor tersebut. Hal ini juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Huang dkk. (2015) bahwa jumlah sel T CD8 yang teraktivasi juga meningkat secara signifikan pada mencit yang diinjeksi secara subkutan dengan *Breast Tumor Cell lines* 4T1 dan E0771 pada bagian jaringan lemak payudara. Sel T CD8 tersebut paling banyak

ditemukan di lokasi tumor sebagai limfosit yang menginfiltrasi jaringan tumor (*Tumor Infiltrating Lymphocytes/TIL*).

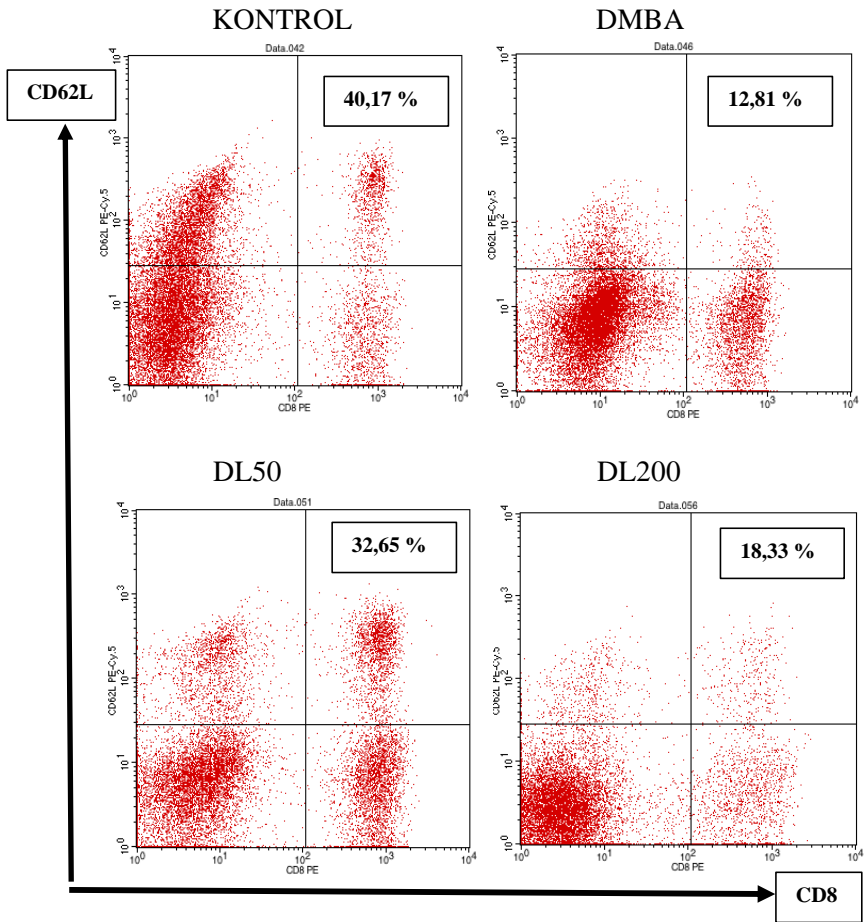
Sel T CD8 berperan dalam sebagian besar respon imunitas terhadap kanker payudara. Pada tahap awal perkembangan tumor payudara, sel T CD8 merupakan salah satu populasi dominan pada *Tumor Infiltrating Lymphocytes* (TIL) yang dapat melakukan *immunosurveillance*. Sel T CD8 merupakan sel efektor utama yang mengendalikan imunitas anti tumor. Jumlah sel T CD8 lebih dominan daripada sel T CD4 pada tahap awal perkembangan tumor. Namun, sel T CD4 lebih cepat menyusup ke lokasi tumor daripada sel T CD8 dalam perkembangan tumor. Oleh karena itu, sel T CD4 menjadi populasi dominan pada stadium akhir pada perkembangan tumor (Huang dkk., 2015).



Gambar 9. Jumlah Relatif Sel T CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>. Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Tukey

Jumlah relatif sel T CD8 naïve pada pemberian ekstrak lemon dosis 50 mg/kg BB yaitu 32,65 % lebih tinggi dibandingkan pemberian ekstrak lemon dengan dosis 200 mg/kg BB yaitu 18,33% dapat dilihat pada (Gambar 10). Pemberian ekstrak lemon dengan dosis 50 mg/kg BB mampu meningkatkan secara signifikan jumlah relatif sel T CD8 naïve

sedangkan jumlah sel T CD8 naïve pada pemberian ekstrak lemon dosis 200 mg/kg BB tidak meningkat secara signifikan (Gambar 9).



Gambar 10. Rata-rata jumlah relatif sel T CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> hasil analisis menggunakan *software* BD Cellquest Pro™

Flavonoid pada *Citrus limon* diketahui sebagai antiinflamasi yang dapat mempegaruhi aktivasi sel-sel yang terlibat dalam respon imun termasuk sel T dan sel B (Okuyama, 2014). Selain flavononoid, hesperidin dan tangeretin pada *Citrus limon* diketahui juga memiliki kemampuan anti-neuroinflamatori yang mampu menekan sekresi sitokin TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 (Ho, 2014). Menurut Pindborg (2000) TNF- $\alpha$ , dan IL-6 yang diinduksi oleh IL-7 akan memperkuat inflamasi dan mendukung pertumbuhan kanker. Arivazhagan & Pillai, (2014) memaparkan bahwa tangeretin yang terkandung dalam *Citrus limon* secara signifikan mampu menekan matriks metalloproteinase (MMP)-2 pada model hewan yang diinduksi DMBA. Menurut Lee dkk., (2009) Tangeretin juga efektif dalam menghambat metastasis pada sel-sel karsinoma MCF-7/6 manusia dengan menekan sekresi MMP-3 dan MMP-9. Sekresi MMP merupakan salah satu tahap yang dilakukan sel kanker saat melakukan invasi.