PENGARUH RAMUAN CHERAL TERHADAP SEL T CD4 DAN MAKROFAG PADA MENCIT (*Mus musculus*) MODEL KANKER PAYUDARA

SKRIPSI

oleh
DHANIAR CHAIRUNNIZA
145090107111026

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

PENGARUH RAMUAN CHERAL TERHADAP SEL T CD4 DAN MAKROFAG PADA MENCIT (*Mus musculus*) MODEL KANKER PAYUDARA

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam Bidang Biologi

oleh
DHANIAR CHAIRUNNIZA
145090107111026

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

PENGARUH RAMUAN CHERAL TERHADAP SEL T CD4 DAN MAKROFAG PADA MENCIT (*Mus musculus*) MODEL KANKER PAYUDARA

DHANIAR CHAIRUNNIZA
145090107111026

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 3Juli 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui
Pembimbing

Drs. Aris Soewondo, M.Si.
NIP. 196411221990021001

Mengetahui
Ketua Program Studi S-1 Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Rodiyati Azrianingsih, S.Si., M.Sc., Ph.D.
NIP 19700128 199412 2 001

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dhaniar Chairunniza
NIM : 145090107111026
Jurusan : Biologi
Penulis Skripsi berjudul : Pengaruh Ramuan Cheral terhadap Sel T CD4 dan Makrofag pada Mencit (*Mus Musculus*) Model Kanker Payudara

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka Skripsi ini semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi Skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran

Malang, 12 Juli 2018
Yang menyatakan

Dhaniar Chairunniza

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

Pengaruh Ramuan Cheral Terhadap Sel T CD4 Dan Makrofag Pada Mencit (*Mus musculus*) Model Kanker Payudara

Dhaniar Chairunniza, Aris Soewondo
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya
2018

ABSTRAK

Kanker payudara merupakan salah satu jenis kanker dengan tingkat kematian mencapai 28% pada wanita. Perawatan kanker dengan kemoterapi dapat menimbulkan beberapa efek samping pada pasien. Pengembangan pengobatan yang lebih aman dengan menggunakan ramuan herbal dibutuhkan dalam penyembuhan kanker. Sitokin pro-inflamasi seperti IL-17, TNFα dan IFNγ berperan penting dalam mempromosikan inflamasi pada jaringan yang terkena tumor. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ramuan Cheral (kombinasi Meniran dan Temu Putih) terhadap sel T CD4 dan makrofag yang mengekspresi sitokin pro-inflamasi IL-17, TNF-α dan IFN-γ pada mencit (*Mus musculus*) model kanker payudara. Penelitian ini dilakukan induksi kanker pada mencit dengan DMBA (7,12-Dimethylbenz[α]Anthracene). Analisis jumlah relatif sel T CD4 dan makrofag yang mengekspresi sitokin pro-inflamasi IL-17, TNF-α dan IFN-γ dilakukan setelah pemberian perlakuan dosis ramuan Cheral meliputi 1,233 mg/kg BB (D1), 2,466 mg/kg BB (D2) dan 4,932 mg/kg BB (D3) selama 14 hari, lalu dianalisis dengan *Flow Cytometry*. Analisis data dilakukan dengan menggunakan *one-way* ANOVA dan uji Tukey HSD dengan nilai signifikansi 95%. Mencit model kanker payudara mengalami peningkatan jumlah relatif dari sel T CD4 dan makrofag yang mensekresi sitokin pro-inflamasi IL-17, TNF-α dan IFN-γ pada organ limfa mencit. Pemberian ramuan Cheral mampu menurunkan jumlah dari sel T CD4 dan makrofag yang mengekspresikan sitokin pro-inflamasi setelah sistem imun berhasil menekan sel-sel kanker. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ramuan Cheral dapat digunakan sebagai terapi alternatif untuk menurunkan sitokin pro-inflamasi pada pasien kanker payudara.

Kata kunci: Cheral, IFN-γ , IL-17, kanker payudara, TNF-α

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

The Effect Of Cheral To T-Cell CD4 And Macrophage In Breast Cancer Model Of Mice (*Mus musculus*)

Dhaniar Chairunniza, Aris Soewondo
Biology Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Brawijaya University
2018

ABSTRACT

The breast cancer is one of the most common types of cancer with a death rate of 28% in women. Cancer treatment with chemotherapy can cause negative effects on patient. Development of a safer treatment such as by using herbs is needed in the healing of cancer. Pro-inflammatory cytokines such as IL-17, TNF-α and IFN-γ play an important role in promoting inflammation in tumor-exposed tissues. This aims of this study was to determine the effect of Cheral potion (combination of Meniran and Temu Putih) to T-cell CD4 and macrophage that expressed pro-inflammatory cytokines (IL-17, TNF-α dan IFN-γ) in breast cancer model of mice (*Mus musculus*). This study carried out cancer induction in mice with DMBA (7,12-Dimethylbenz[α]Anthracene). Analysis of the relative amount of CD4 and macrophage cells that expressed pro-inflammatory cytokines (IL-17, TNF-α and IFN-γ) were performed after Cheral potion treatment of 1.233 mg/kg BB (D1), 2.466 mg/kg BB (D2) dan 4.932 mg/kg BB (D3) for 14 days, then analyzed by flowsitometry. Data analysis was performed by using one-way ANOVA and Tukey HSD test with confidence interval 95%. Mice models of breast cancer have increased relative numbers of T-cell CD4 and macrophage that expressed pro-inflammatory cytokines (IL-17, TNF-α and IFN-γ) in spleen organ of mice. Cheral potion provision can reduce the number of CD4 and macrophage cells that secrete pro-inflammatory cytokines after the immune system successfully suppress cancer cells. The results of this study showed that Cheral potion can be used as an alternative therapy to decrease pro-inflammatory cytokines in breast cancer patients.

Keywords: Breast cancer, cheral, IFN-γ , IL-17, TNF-α

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KATA PENGANTAR

Alhamdulillaahi Robbil Aalamiin, dengan segala ungkapan rasa syukur pada Allah Yang Maha Kuasa akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Biologi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Bapak Drs. Aris Soewondo, M.Si. selaku dosen pembimbing yang telah mendampingi dan memberi pengarahan, serta tambahan ilmu dan saran-saran yang berguna bagi penulis.
2. Bapak Sudarso dan Ibu Heny Ratna Mufidah selaku orang tua Penulis atas doa restu dan motivasi yang telah diberikan selama ini.
3. Rizky Amelia, Sofia Nur Hasanah dan Nadia Nur Indah Dini Islam selaku kakak dan adik Penulis yang telah memberikan semangat dalam penyusunan skripsi.
4. Bapak Prof. Muhaimin Rifa'i, M.Si, Ph.D.Med.Sc. dan Drs. Sofy Permana, M.Sc., D.Sc. selaku dosen penguji yang telah memberi saran yang bermanfaat demi perbaikan penyusunan skripsi.
5. Feri Eko Fermanto, Devita Ratnasari, Anoraga Mona L. S. M. dan Sella Septiana Pungki selaku rekan tim Penelitian Cheral atas kerjasamanya selama penelitian.
6. Rekan-rekan Laboratorium Biologi Molekuler, Amino 2014 dan seluruh civitas akademika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

Penulisan skripsi ini merupakan upaya optimal penulis sebagai sarana terbaik dalam pengembangan ilmu pengetahuan. Saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan untuk menjadikan karya ini semakin bermanfaat.

Malang, 12 Juli 2018

Penulis

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR ISI

		Halaman
ABSTRAK		**v**
ABSTRACT		**vi**
KATA PENGANTAR		**vii**
DAFTAR ISI		**viii**
DAFTAR GAMBAR		**x**
DAFTAR LAMPIRAN		**xii**
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN		**xiii**
BAB I PENDAHULUAN		**1**
1.1	Latar Belakang	1
1.2	Rumusan Masalah	3
1.3	Tujuan Penelitian	3
1.4	Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA		**5**
2.1	Meniran (*Phyllanthus urinaria)*	5
2.2	Temu Putih (*Curcuma zedoaria*)	6
2.3	Kanker	7
2.4	Kanker Payudara	9
2.5	Regulasi Sistem Imun pada Kanker Payudara	10
2.6	Cisplatin	12
2.7	Sel T CD4	13
2.8	Sel Th-17	14
2.9	Makrofag	17
BAB III METODE PENELITIAN		**19**
3.1	Waktu dan Tempat	19
3.2	Deskripsi Hewan Coba	19
3.3	Rancangan Penelitian	19
3.4	Induksi Kanker Payudara pada Mencit	19
3.5	Pemberian Ramuan Cheral dan Cisplatin	20
3.6	Isolasi Organ Limpa dan Perhitungan Sel.	20
3.7	Prosedur Analisis Jumlah relatif IL-17 TNFα dan IFNγ dengan *Flowcytometry*	21
3.8	Analisis Data	22

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN..... 23
4.1 Kondisi Mencit setelah Diinduksi DMBA 23
4.2 Jumlah Relatif Sel $CD4^{+}IL\text{-}17^{+}$ dan Makrofag $CD11b^{+}IL\text{-}17^{+}$..... 25
4.3 Jumlah Relatif Sel T $CD4^{+}TNF\alpha^{+}$ $IFN\gamma^{+}$ 31

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN 35
5.1 Kesimpulan..... 35
5.2 Saran..... 35

DAFTAR PUSTAKA 36
LAMPIRAN 42

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1	Tanaman Meniran (*Phyllanthus urinaria*).....	5
2	Rimpang Temu Putih (*Curcuma zedoaria*)	7
3	Anatomi dan histologi pada *benign* dan *malignant* tumor payudara.....	10
4	Regulasi NF-κB yang berperan penting dalam sel.....	11
5	Struktur kimia Cisplatin……	13
6	Peran IL-17A dan IL-17F.....	16
7.	Normal *terminal duct-lobular unit* (TDLU) pada lobus payudara…….	23
8.	Histologi kanker payudara Mencit setelah diinduksi dengan DMBA (perbesaran 400x)……	24
9.	Rerata penurunan jumlah relatif sel T $CD4^{+}IL-17^{+}$ pada kelompok perlakuan dosis Cheral dan Cisplatin…….....	27
10.	Rerata penurunan jumlah relatif $CD11b^{+}IL-17^{+}$ pada kelompok perlakuan dosis Cheral dan Cisplatin…….	29
11.	Rerata penurunan jumlah relatif sel T $CD4^{+}TNF\alpha^{+}$ $IFN\gamma^{+}$ pada kelompok perlakuan dosis Cheral dan Cisplatin…….	32

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	Surat keterangan kelaiakan etik penelitian…….	42
2	Hasil uji ANOVA jumlah relatif sel $CD^{+}IL\text{-}17^{+}$ dan $CD11b^{+}IL\text{-}17^{+}$	43
3	Hasil uji Tukey HSD jumlah relatif sel $CD^{+}IL\text{-}17^{+}$…….....	43
4	Hasil uji Tukey HSD jumlah relatif $CD11b^{+}IL\text{-}17^{+}$.....	43
5	Hasil uji ANOVA jumlah relatif $CD4^{+}TNF\text{-}\alpha^{+}$ $IFN\text{-}\gamma^{+}$.....	44
6	Hasil uji Tukey HSD jumlah relatif sel $CD4^{+}TNF\text{-}\alpha^{+}IFN\gamma^{+}$ …….....	44

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

Simbol/Singkatan	Keterangan
DPPH	1,1-diphenil-2-picryhydrazyl
DMBA	7,12-Dimethylbenz[A]Anthracene
APC	*Antigen Precenting Cells*
TLR	*Toll Like Receptor*
CTL	*Cytotoxic* T *Lymphocyte*
NK	*Natural Killer*
TCR	T-*Cell Receproр*
TLS	*Tertiary Lymphoid Structures*
LN	*Limph Node*
CD4	*Cluster of Differentiation 4*
IL	*Interleukin*
Th	T *helper*
Treg	T *regulator*
FOXP3	*Forkhead Box P3*
AhR	*Aryl Hydrocarbon receptor*
BMC	*Bone Marrow Cell*
BMDC	*Bone Marrow-Derived Cell*
TAM	*Tumor Associated Macrophages*
MSC	*Mesenchymal Stem Cell*
RORγt	*Retinoic Acid-Releted Ophan Receptor γt*
TNF-α	*Tumor Necrosis Factor-alpha*
IFN-γ	*Interferon-gamma*
NO	*Nitric Oxide*
ROS	*Reactive Oxygen Species*
PI3K/Akt	*Phosphoinositide 3-Kinase/Serine-Threonine Kinase Akt*
RAS/MEK/ERK	*a.k.a. MAPK/ERK, Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinases*
NF-κB	*Nuclear Factor Kappa-B*
ERK1/2	*Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase 1 and 2*
MMP-2	*Matrix Metalloproteinase-2*
PBS	*Phospate Buffer Saline*
HCC	*Hepatocellular Carcinoma*
RE	*Retikulum Endoplasma*
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

BAB I
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker adalah gangguan hiperproliferatif yang melibatkan transformasi morfologi seluler, disregulasi apoptosis, proliferasi seluler yang tidak terkendali, invasi, angiogenesis, dan metastasis (Lin & Karin, 2007). Kanker awalnya berupa benjolan atau disebut dengan tumor. Tumor sendiri dapat bersifat jinak (*benign*) dan ganas (*malignant*). Kanker dapat menyerang berbagai organ manusia seperti jantung, paru-paru, prostat, hati, kolon, serviks dan payudara (Weinberg, 2007). Studi klinis dan epidemiologi telah menunjukkan adanya hubungan yang kuat antara infeksi kronis, peradangan dan kanker. Peradangan kronis terlibat dalam inisiasi tumor (proses di mana sel-sel normal diubah secara genetis sehingga mereka menjadi ganas), promosi (proses dimana kelompok kecil sel ganas dirangsang untuk tumbuh) dan perkembangan (proses dimana tumor yang tumbuh menjadi lebih agresif) (Lin & Karin, 2007).

Kanker payudara terjadi karena ketidakseimbangan pada siklus sel sehingga pertumbuhan sel-sel pada jaringan epitel duktus ataupun lobulusnya tidak berfungsi dengan normal (Bauer dkk., 2007). Kasus kanker payudara di setiap negara berbeda-beda, akan tetapi kanker lebih banyak terjadi di negara maju karena berkaitan dengan pola hidup pada negara tersebut. Di Amerika Serikat, karsinoma payudara memiliki persentase sekitar 25% dari semua jenis kanker dan menyebabkan sekitar 20% kematian di kalangan wanita. Kasus kanker payudara pada pria cukup langka dan hanya terdiri dari 0,2% kasus tumor ganas. Rasio penderita kanker payudara antara pria:wanita adalah 1:100. Kejadian kanker payudara tertinggi terjadi pada kelompok umur premenopause dan jarang terjadi sebelum usia 25 tahun (Mohan, 2010). Rasio jumlah penderita kanker payudara di Indonesia adalah 12/10.000 dengan tingkat kematian mencapai 28% pada wanita (Kemenkes RI, 2013).

Kanker payudara merupakan salah satu penyebab utama kematian pada wanita di seluruh dunia. Kemoterapi adalah salah satu pilihan untuk mengobati kanker payudara dan untuk meningkatkan masa hidup pasien. Agen kemoterapi telah banyak dikembangkan untuk mengatasi masalah kanker payudara, salah satunya Cisplatin.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Namun sebagian besar obat kemoterapi secara efektif menargetkan dengan cepat terjadinya pembelahan sel-sel yang dapat menyebabkan kerusakan. Efek toksik yang dihasilkan oleh obat terapi Cisplatin terjadi karena kerja obat tersebut yang menyebabkan penghambatan replikasi DNA dan menginduksi apoptosis (Dasary & Tchounwou, 2014). Banyaknya kasus dan tingginya tingkat kematian yang terjadi pada penderita kanker payudara dan adanya efek toksik pada obat terapi, dibutuhkan pengembangan pengobatan yang lebih aman untuk penyembuhan kanker. Pengembangan pengobatan dilakukan, baik secara modern maupun tradisional. Penelitian ini dikhususkan untuk mengembangan pengobatan kanker secara tradisional dengan memanfaatkan keanekaragaman flora yang terdapat di Indonesia, dengan meneliti pengaruh kandungan zat aktif pada tanaman tersebut terhadap sel-sel imunokompeten yang berperan dalam menyembuhkan kanker sehingga dapat dikonsumsi sebagai ramuan obat herbal.

Cheral merupakan produk ramuan obat herbal yang kini dikembangkan untuk penyembuhan kanker. Komposisi Cheral terdiri dari campuran tanaman Meniran (*Phyllanthus urinaria)* dan rimpang Temu Putih (*Curcuma zedoaria*). *Phyllanthus urinaria,* termasuk salah satu tanaman herbal yang tersebar luas di China, India Selatan dan Amerika Selatan. *P. urinaria* banyak digunakan dalam pengobatan tradisional seperti pengobatan untuk penyakit hepatitis B, neprolithiasis (Lu dkk., 2013). *Curcuma zedoaria* termasuk dalam famili *Zingiberaceae,* merupakan tanaman yang banyak tumbuh di Asia. *Curcuma zedoaria* telah lama digunakan sebagai obat tradisional (Mau dkk., 2003).

Zat aktif yang terkandung dalam Cheral berperan penting dalam penyembuhan kanker. Menurut Huang dkk., (2002), ekstrak *P. urinaria* mengandung glikosida, molekul 7V-hydroxy-3V, 4V, 5,9, 9V-pentamethoxy-3,4-methylene dioxy yang terbukti dapat digunakan sebagai anti-tumor atau anti-kanker. Mau dkk., (2003) menyatakan, senyawa antioksidan yang terkandung dalam Temu Putih (*Curcuma zedoaria*) yang paling baik adalah 5-isopropylidene-3,8-dimethyl-1(5H)-azulenone, senyawa antioksidan tersebut bermanfaat sebagai anti-kanker. *Curcuma zedoaria* telah lama digunakan sebagai obat tradisional dan terdapat kandungan

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

curcumin, 36 senyawa yang teridentifikasi dalam minyak esensial, termasuk 17 terpen, 13 alkohol dan 6 keton.

Penggunaan Cheral sebagai obat herbal pada pasien kanker dapat diketahui kemampuannya dengan mengamati jumlah sel imunokompeten seperti sel T CD4 dan makrofag yang mengekspresi sitokin pro-inflamasi pada bagian yang terdapat tumor. Sel $CD4^+$ merupakan glikoprotein yang ditemukan pada permukaan sel imun seperti sel Th, monosit, makrofag dan sel dendrit (Janeway dkk., 2001). Sel Th-1 yang merupakan salah satu subset dari sel T CD4 paling sering dikaitkan dengan anti-tumor supresor pada sistem imun di kanker payudara (Chunyan dkk., 2013). Subset lain dari CD4 yaitu T_{reg} umumnya memiliki jumlah yang lebih tinggi pada penderita *invasive breast ductal carcinoma* daripada individu normal (Udaya dkk., 2002). Interleukin 17 (IL-17) merupakan sitokin proinflamatori yang diproduksi oleh sel Th dan diinduksi oleh IL-23. CD11b merupakan α-subunit dari predominan integrin β_2 (CD18) yang diekspresikan pada monosit atau makrofag dan granulosit. Antibodi monoklonal CD11b digunakan untuk mencegah pengrekrutan dari sel myeloid pada penderita tumor (Ahn dkk., 2010). Oleh karena itu pengamatan dilakukan pada jumlah relatif sel imunokompeten seperti sel T CD4 dan makrofag pada penderita kanker setelah mengkonsumsi ramuan Cheral, agar dapat diketahui pengaruh ramuan Cheral dalam proses penyembuhan kanker dengan menurunkan jumlah dari sel-sel pro-inflamasi.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dapat diambil dari latar belakang penelitian ini adalah apakah ramuan Cheral berpengaruh terhadap jumlah relatif sel T CD4 dan makrofag yang mengekspresikan sitokin pro-inflamasi pada Mencit (*Mus musculus*) model kanker payudara?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ramuan Cheral terhadap jumlah relatif sel T CD4 dan makrofag yang mengekspresikan sitokin pro-inflamasi pada Mencit (*Mus musculus*) model kanker payudara.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah dapat melengkapi informasi terkait pengaruh ramuan Cheral terhadap jumlah relatif sel T CD4 dan makrofag yang mengekspresikan sitokin pro-inflamasi pada Mencit yang terinfeksi kanker payudara, sehingga penelitian ini mampu digunakan sebagai tambahan informasi dalam pertimbangan konsumsi ramuan Cheral atau sebagai acuan dalam penelitian selanjutnya.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Meniran (*Phyllanthus urinaria)*

Phyllanthus urinaria merupakan salah satu bahan yang terkandung dalam Cheral. *Phyllanthus urinaria*, termasuk salah satu tanaman herbal dengan genus *Phillanthus* dengan famili Euphorbiaceae yang tersebar luas di negara tropis dan subtropis, seperti Malaysia, Indonesia, China, India Selatan dan Amerika Selatan (Lu dkk., 2013). *Phyllanthus urinaria* (Gambar 1) termasuk tanaman musiman yang tumbuh dengan tinggi sekitar 60-70 cm dengan pola bercabang, memiliki daun berwarna hijau dengan tipe majemuk, tata letak daun berseling yang berbentuk oval dan memiliki bunga tunggal berwarna putih dan buah yang berbentuk seperti bulir-bulir bulat kecil berwarna hijau (Theerakulpisut dkk., 2008).

(Allison, 2012)

Gambar 1. Tanaman Meniran (*Phyllanthus urinaria*)

Phyllanthus urinaria memiliki berbagai macam kandungan antioksidan, seperti polifenol (Mahdi dkk., 2011). *Phyllanthus urinaria* banyak digunakan dalam pengobatan tradisional seperti

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

pengobatan untuk penyakit hepatitis B, neprolithiasis. *P. urinaria* juga dapat digunakan sebagai antiinflamatori, antiviral, antibakteri dan antihepatotoksik. Ekstrak *P.urinaria*, pada kisaran konsentrasi (0 sampai 100 lg/ml) dapat menghambat aktivator plasminogen jenis urokinase (u-PA) dan Matriks Metalloproteinase-2 (MMP-2) aktivitas enzim serta ekspresi protein. Selain itu ekstrak *P. urinaria* dapat menghambat fosforilasi ERK1/2 (Lu dkk., 2013). Ekstrak *P. urinaria* mengandung glikosida, molekul 7V-hydroxy-3V, 4V, 5,9, 9V-pentamethoxy-3,4-methylene dioxy yang terbukti dapat digunakan sebagai anti-tumor atau anti-kanker. Ekstrak *P. urinaria* tidak memberikan efek sitotoksik pada sel normal dan efek anti-kanker lebih spesifik pada sel tumor (Huang dkk., 2002).

2.2 Temu Putih (*Curcuma zedoaria)*

Curcuma zedoaria termasuk dalam famili Zingiberaceae, merupakan tanaman yang banyak tumbuh di Asia. *Curcuma zedoaria* (Gambar 2) di Indonesia lebih dikenal dengan sebutan Temu Putih. Tumbuhan ini termasuk tumbuhan tahunan dengan tinggi mencapai 2 m dan daunnya berbentuk lanset. Rimpangnya berwarna putih atau kuning muda. Tumbuhan *Curcuma zedoaria* tersebar di negara-negara Asia China, India, Jepang, Vietnam dan Indonesia. *Curcuma zedoaria* telah lama digunakan sebagai obat tradisional dan terdapat kandungan 36 senyawa yang teridentifikasi dalam minyak esensial, termasuk 17 terpen, 13 alkohol dan 6 keton. Pada 20 mg/mL minyak esensial dari *C. zedoaria* terdapat aktivitas antioksidan yang cukup baik dalam mengurangi efek radikal 1,1-diphenil-2-picrylhydrazyl (DPPH). Senyawa antioksidan yang terkandung dalam *C. zedoaria* yang paling baik adalah 5-isopropylidene-3,8-dimethyl-1(5H)-azulenone (Mau dkk., 2003). Menurut Himaja dkk., (2010), hasil ekstraksi dari *C. zedoaria* mengandung terpenoid, alkaloid, saponin, flavonoid, glikosida dan karbohidrat, fenolik, tannin dan fitosterol. Semua kandungan senyawa pada *C. zedoaria* berperan penting untuk berbagai aktivitas biologis. Aktivitas antioksidan (DPPH) semua ekstrak kasar dari *C. zedoaria* menunjukkan adanya aktivitas antioksidan maksimum pada ekstrak etil asetat, n-heksana dan air.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

(Mangan, 2009)

Gambar 2. Rimpang Temu Putih (*Curcuma zedoaria)*

Ekstrak metanol dari tanaman *C. zedoaria* dianalisis senyawa total fenolnya untuk mengetahui sifat fungsionalnya, didapatkan bahwa kandungan dalam *C. zedoaria* dapat mengurangi daya dan aktifitas pemuluran dari senyawa radikal α, α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH). Uji antibakteri pada kandungan *C. zedoaria* menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap semua mikroorganisme yang diuji (Cheng dkk., 2008). Menurut Wilson dkk., (2005), aktivitas antimikroba pada ekstrak *C. zedoaria* telah diuji terhadap 6 strain bakteri dan 2 strain jamur. Hasil analisis menunjukkan ekstrak etanol, heksana, kloroform dan aseton pada *C. zedoaria* memiliki aktivitas antibakteri dan antijamur.

2.3 Kanker

Kanker atau neoplasma ganas adalah penyakit yang ditandai dengan kelainan siklus sel khas yang menimbulkan kemampuan sel untuk tumbuh tidak terkendali (pembelahan sel melebihi batas normal), menyerang jaringan di dekatnya dan bermigrasi ke jaringan tubuh yang lain melalui sirkulasi darah atau sistem limfatik, yang disebut dengan metastasis. Kondisi-kondisi yang dapat menyebabkan perubahan sel normal menjadi sel kanker adalah hiperplasia, displasia, dan neoplasia. Hiperplasia adalah keadaan saat sel normal

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

dalam jaringan bertumbuh dalam jumlah yang berlebihan. Displasia merupakan kondisi ketika sel berkembang tidak normal dan pada umumnya terlihat adanya perubahan pada nukleusnya. Pada tahapan ini ukuran nukleus bervariasi, aktivitas mitosis meningkat, dan tidak ada ciri khas sitoplasma yang berhubungan dengan diferensiasi sel pada jaringan. Neoplasia merupakan kondisi sel pada jaringan yang sudah berproliferasi secara tidak normal dan memiliki sifat invasif. Pertumbuhan yang tidak terkendali tersebut disebabkan kerusakan DNA, menyebabkan mutasi di gen vital yang mengontrol pembelahan sel. Beberapa mutasi mungkin dibutuhkan untuk mengubah sel normal menjadi sel kanker. Mutasi-mutasi tersebut sering diakibatkan agen kimia maupun fisika yang disebut karsinogen. Mutasi dapat terjadi secara spontan (diperoleh) ataupun diwariskan (mutasi) (Weinberg, 2007). Kelainan siklus sel, antara lain terjadi saat: (a) perpindahan fase G1 menuju fase S; (b) siklus sel terjadi tanpa disertai dengan aktivasi faktor transkripsi. Penyerapan hormon tiroid beta1 (TRbeta1) merupakan faktor transkripsi yang diaktivasi oleh hormon T3 dan berfungsi sebagai supresor tumor dan gangguan gen THRB yang sering ditemukan pada kanker; (c) siklus sel terjadi dengan kerusakan DNA yang tidak terpulihkan; (d) translokasi posisi kromosom yang sering ditemukan pada kanker sel darah putih seperti leukimia atau limfoma, atau hilangnya sebagian DNA pada domain tertentu pada kromosom. Pada leukimia mielogenus kronis, 95% penderita mengalami translokasi kromosom 9 dan 22, yang disebut kromosom filadelfia.

Menurut Weinberg (2007), pada umumnya kanker dirujuk berdasarkan jenis organ atau sel tempat terjadinya kanker. Sebagai contoh, kanker yang bermula pada usus besar dirujuk sebagai kanker usus besar, sedangkan kanker yang terjadi pada sel basal dari kulit dirujuk sebagai karsinoma sel basal. Klasifikasi kanker kemudian dilakukan pada kategori yang lebih umum, misalnya karsinoma, merupakan kanker yang terjadi pada jaringan epitel, seperti kulit atau jaringan yang menyelubungi organ tubuh, misalnya organ pada sistem pencernaan atau kelenjar. Contohnya kanker kulit, karsinoma serviks, karsinoma anal, kanker esofageal, karsinoma hepatoselular, kanker laringeal, hipernefroma, kanker lambung, kanker testiskular dan kanker tiroid. Sarkoma, merupakan kanker yang terjadi pada tulang seperti osteosarkoma, tulang rawan seperti kondrosarkoma,

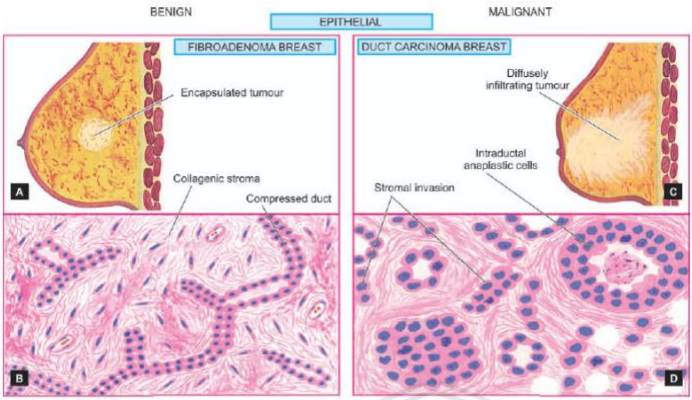
repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

jaringan otot seperti rabdomiosarcoma, jaringan adiposa, pembuluh darah dan jaringan penghantar atau pendukung lainnya. Leukemia, merupakan kanker yang terjadi akibat tidak matangnya sel darah yang berkembang di dalam sumsum tulang dan memiliki kecenderungan untuk berakumulasi di dalam sirkulasi darah. Limfoma, merupakan kanker yang timbul dari nodus limfa dan jaringan dalam sistem kekebalan tubuh.

2.4 Kanker Payudara

Kanker payudara merupakan kanker yang berasal dari jaringan mamae dan juga sering berasal dari lapisan dalam duktus atau lobulus. Kanker yang berasal dari duktus dikenal sebagai karsinoma duktal dan berasal dari lobulus dikenal sebagai karsinoma lobular. Kanker payudara sering disebut dengan karsinoma, karena pertumbuhan sel kanker sering bermula dari sel epitel. Berdasarkan asal dan karakter histologinya, kanker payudara dikelompokkan menjadi dua kelompok besar yaitu in situ karsinoma dan invasif karsinoma (Gambar 3). Karsinoma *in situ* dikarakterisasi oleh lokalisasi sel tumor baik di duktus maupun di lobular, tanpa adanya invasi melalui membran basal menuju stroma di sekelilingnya. Sebaliknya pada invasif karsinoma, membran basal akan rusak sebagian atau secara keseluruhan dan sel kanker akan mampu menginvasi jaringan di sekitarnya menjadi sel metastatik. Penanganan kanker payudara tergantung stadium, agresivitas, dan susunan genetik. Lama harapan hidup dari penderita kanker payudara bervariasi tergantung pada faktor tersebut (Hunt, 2009). Kanker payudara seringkali disebabkan oleh genetik dan epigenetik perubahan gen yang mengatur fungsi epitel pada sel mamae. Untuk mencegah terjadinya perkembangan kanker payudara, dibutuhkan mekanisme yang dapat melakukan penekanan pada tumor dengan menginduksi apoptosis sel-sel neoplasma. Sistem imun diketahui dapat menekan perkembangan tumor dengan menghilangkan sel-sel epitel yang telah mengalami perubahan menjadi sel-sel kanker payudara dan membatasi pertumbuhan sel tersebut ketika lolos dari mekanisme penekanan tumor (Jiang & Shapiro, 2014).

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



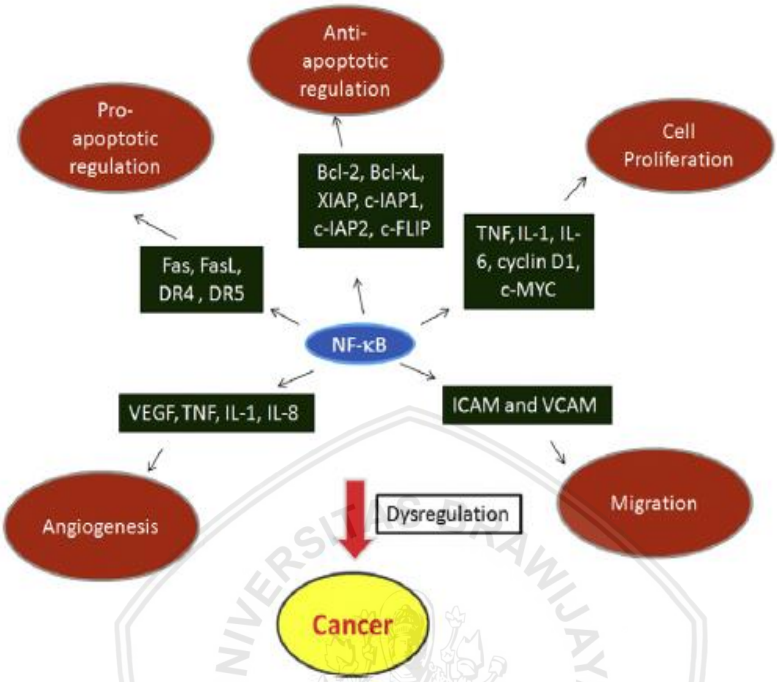
(Mohan, 2010)

Gambar 3. Anatomi dan histologi pada *benign* dan *malignant* tumor payudara

2.5 Regulasi Sistem Imun pada Kanker Payudara

Sistem imun dalam tubuh akan teraktivasi jika ada bahan asing (antigen) beredar di dalam tubuh setelah masuk melalui dinding sel. Hal ini disebabkan pertahanan pertama tubuh tidak mampu menetralisir agen infeksi sehingga agen infeksi tersebut masuk dan beredar melalui peredaran darah ke seluruh tubuh. Pertahanan pertama yang bertanggung jawab terhadap serangan agen infeksi adalah sel imun non spesifik (*innate immunity*) seperti sel monosit, makrofag, neutrofil, basofil, sel dendrit, sel Langerhan dan sel mast. Jika sel-sel tersebut tidak mampu menetralisir agen infeksi maka selanjutnya terjadilah penginfeksian dan kemudian sistem pertahanan kedua muncul yang dikenal *adaptive immune responses*. Pertahanan kedua aktif setelah terjadi komunikasi diantara sel imun yang didahului adanya sekresi sitokin dan ekspresi peptida antigen ke permukaan sel imun nonspesifik yang dikenal dengan *Antigen Precenting Cells* (APC) dan selanjutnya akan mengaktifkan sel B dan sel T (Janeway dkk., 2001).

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



(Bhatelia & Singh, 2014)

Gambar 4. Regulasi NF-κB yang berperan penting dalam sel

Sistem imun *innate* dalam tubuh memiliki bagian penting yaitu *Toll like resceptor* (TLRs) yang merupakan reseptor transmembran. Tubuh yang terinfeksi patogen, maka molekulnya akan berinteraksi dengan TLR pada permukaan sel sehingga menginduksi terjadinya peristiwa pensinyalan yang mengaktifkan faktor transkripsi IRF atau NF-κB yang pada akhirnya mengarah terekspresinya gen IRFs dan NF-κB yang memainkan peran penting dalam sistem imun bawaan. Peran tersebut juga memicu terekspresinya beberapa sitokin dan kemokin pro-inflamasi. Sitokin pro-inflamasi mengaktifkan berbagai leukosit yang dapat menguatkan tingkat dari sitokin pro-inflamasi. Adanya sitokin pro-inflamasi mendukung proses angiogenesis dan migrasi sel yang mendukung pertumbuhan tumor. Regulasi NF-κB membantu menjelaskan keterkaitan inflamasi dengan kanker pada

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

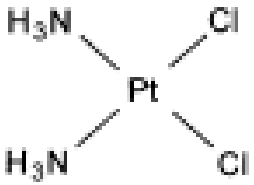
tingkat molekuler (Gambar 4). Disregulasi NF- κB telah banyak diaati pada kanker payudara. Adanya penghambatan NF-κB dapat mengarah ke apoptosis dan perubahan hepatosit. Faktor transkripsi NF-κB menstimulasi beberapa gen yang memainkan peran penting dalam kelangsungan hidup sel, resistensi sel terhadap kematian migrasi dan angiogenesis (Bhatelia & Singh, 2014).

Sel imun efektor utama yang dapat mengeliminasi sel-sel kanker payudara adalah sel $CD8^+$, *Cytotoxic T Lymphocyte* (CTL) dan *Natural Killer* (NK). Sel T $CD8^+$ memiliki aktivitas anti tumor yang signifikan terhadap kanker payudara. Sel NK merupakan sel-sel imun *innate* yang dapat membunuh sel tumor tanpa adanya pengenalan dari MHC. Disfungsi sel NK dikaitan dengan perkembangan kanker payudara. Sel-sel NK tidak hanya menekan perkembangan kanker payudara manusia, tetapi juga bertindak sebagai faktor anti-tumor pada kanker payudara yang diobati dengan kemoterapi atau imunoterapi. Selain itu sel NK juga berperan penting dalam pencegahan terjadinya metastasis kanker payudara. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa sel CTL dan sel NK dapat menjadi efektor anti tumor yang kuat (Jiang & Shapiro, 2014).

2.6 Cisplatin

Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum(III)) merupakan senyawa logam (platinum) berupa bubuk kristal berwarna putih sampai kuning pada suhu ruang. Bersifat sedikit larut dengan air dan larut dalam Dimethylprimanide dan N,Ndimethylformamide (Dasary & Tchounwou, 2014). Cisplatin memiliki struktur kimia atom platinum pada bagian tengah dan dikelilingi dengan dua atom klorin dan dua gugus ammonia (Gambar 5) (Desoize & Madoulet, 2002). Menurut Galluzzi dkk., (2012) Cisplatin merupakan salah satu senyawa dasar dari platinum yang cara kerjanya memberikan aktivitas klinis sebagai obat anti-kanker. Cisplatin pertama kali disintesis pada tahun 1844 dan pada saat itu diberi nama klorida peyrone. Pada tahun 1970 Rosenberg melakukan penelitian dengan menggunakan Cisplatin yang melaporkan adanya aktivitas penghambatan pembelahan sel pada *Escherichia coli* (Desoize & Madoulet, 2002). Penemuan tersebut yang menjadi cikal bakal penggunaan Cisplatin sebagai obat anti-kanker.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



(Fuertes dkk., 2002)

Gambar 5. Struktur kimia Cisplatin

Cisplatin sebagai agen kemoterapi terhadap sel kanker bekerja dengan menghambat sintesis DNA atau penghambatan saturasi kapasitas seluler untuk memperbaiki tambahan platinum pada DNA. (Desoize & Madoulet, 2002). Cisplatin memberikan efek anti-kanker melalui jalur pensinyalan yang terjadi karena konsentrasi ion klorida yang relatif rendah, sehingga Cisplatin menyebabkan ketidak seimbangan redoks yang menuju terjadinya stres oksidatif. Cisplatin menunjukkan awal keberhasilan terapeutik yang terkait respon parsial atau stabilitas penyakit, namun pada beberapa pasien kanker kolorektal, paru-paru dan prostat menunjukkan adanya resistensi terhadap terapi Cisplatin (Galluzzi dkk., 2012). Cisplatin dapat menginduksi produksi ROS yang tinggi sehingga dapat memicu terjadinya stres oksidatif dan kematian sel. Stres oksidatif adalah salah satu mekanisme yang paling penting yang terlibat dalam toksisitas Cisplatin. Mitokondria merupakan target utama dari stres oksidatif yang diinduksi Cisplatin. Cisplatin mengakibatkan hilangnya gugus protein sulfhydryl pada mitokondria, inhibisi penyerapan kalsium dan pengurangan potensial membran mitokondria (Dasary & Tchounwou, 2014). Adanya efek samping yang cukup tinggi yang disebabkan oleh Cisplatin, berdampak pengurangan penggunaan Cisplatin sebagai agen kemoterapi agar memberikan keamanan dalam proses penyembuhan pada pasien kanker.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

2.7 Sel T CD4

Sel $CD4^+$ merupakan glikoprotein yang ditemukan pada permukaan sel imun seperti sel Th, monosit, makrofag dan sel dendrit. Pada manusia protein CD4 dikode oleh gen CD4. Sel Th $CD4^+$ merupakan sel darah putih yang bagian paling esensial dari sistem imun manusia. CD4 merupakan ko-reseptor yang membantu reseptor sel T (TCR) untuk komunikasi dengan *antigen presenting cell* (APC). Sel T CD4 mengamplikasi sinyal pada TCR menggunkan domain intraseluler dengan merekrut enzim tyrosine kinase yang esensial untuk aktivasi beberapa komponen molekul pada *signaling cascade* dari aktivasi sel T. Sel T CD4 juga berinteraksi secara langsung dengan molekul MHC kelas II pada permukaan APC menggunakan domain ekstraseluler. Sel T $CD4^+$ akan mengenali antigen yang diikat oleh MHC kelas II. Sel T $CD4^+$ berperan sebagai sel Th dan Sel T regulator (Janeway dkk., 2001).

Sel Th1 merupakan subset dari sel T yang paling sering dikaitkan dengan anti-tumor supresor pada sistem imun pada kasus kanker payudara. Sel Th merupakan penyusun penting dari struktur limfoid tersier (TLS) pada tumor payudara. Sel TNF pada *limph node* (LN) sangat aktif dan berpartisipasi dalam pengembangan dan diferensiasi *germinal center* (GC) (Chunyan dkk., 2013). Menurut Udaya dkk., (2002), garis keturunan $CD4^+$ yang unik yaitu sel T yang menekan fungsi sel T efektor memberikan peranan pada mekanisme dasar homeostasis sistem imun. Sel-sel yang disebut sel T regulatori (T_{reg}) adalah sel yang dikarakterisasi oleh ko-ekspresi dari CD4 dan IL-2R α-chain (CD25). Sel $CD4^+$ T_{reg} mampu menurunkan dan mengatur aktivitas sel efektor melawan tumor. Umumnya T_{reg} limfosid $CD4^+25^+$ jumlahnya lebih tinggi di penderita *invasive breast ductal carcinoma* daripada individu normal.

2.8 Sel Th-17

Interleukin 17 merupakan sitokin penanda yang baru diidentifikasi oleh sel sel Th 17 (Th17). Interleukin-17 (IL-17) diproduksi oleh subset Th 17 (Th17) sel T $CD4^+$. Sel Th17 sangat istimewa, dimana sel ini dapat menghasilkan IL-17A, IL-17F, IL-21 dan IL-22. IL-17 disini berperan penting dalam pengembangan penyakit, alergi dan autoimun serta berperan pada mekanisme

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

perlindungan terhadap infeksi bakteri dan jamur yang mana fungsi sebelumnya dimediasi oleh sel TH1 dan Th2. Gen IL-17A, awalnya disebut dengan limfosit T sitotoksik terkait gen antigen 8 (CTLA8), dimana lokasi gen untuk IL-17 adalah 6p12 yang pertama kali diklon dari *murine cytotoxic T lymphocyte* (CTL) (Iwakura dkk., 2011). Menurut Jay & Linden (2004), IL-17A merupakan anggota famili IL-17 prototypic, karena merupakan glikoprotein homodimerik disulfida yang terdiri dari 155 residu asam amino, sebagai homodimer dengan berat molekul sekitar 35 kDa. Hasil *cloning* berdasarkan homologi untuk IL-17, berhasil mengungkapkan 5 anggota famili tambahan dari IL-17 yaitu IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E dan IL-17F. Molekul-molekul dari ke 5 anggota tambahan IL-17 ini juga membentuk homodimer dan menunjukkan adanya konservasi di daerah c-terminalnya.

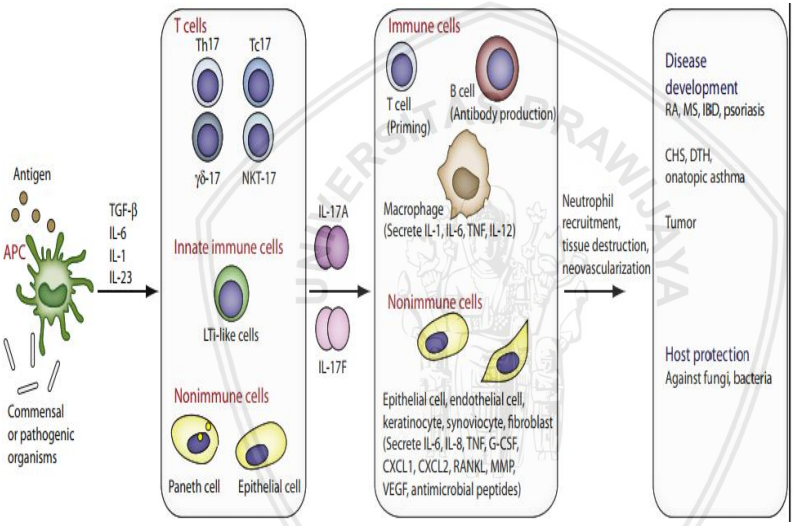
Interleukin 17 (IL-17) merupakan sitokin pro-inflamatori yang diproduksi oleh sel T-helper dan diinduksi oleh IL-23. IL-17 berperan sebagai mediator yang kuat pada penundaan tipe reaksi oleh peningkatan produksi kemokin pada beberapa jaringan. Sinyal dari IL-17 merekrut monosit dan neutrofil pada tempat yang terjadi inflamasi sebagai respon untuk invasi dari patogen. Pada saat mempromosikan inflamasi, IL-17 akan tersebar untuk melakukan tindakan yang bersinergi dengan *tumor necrosis factor* (TNF) dan interleukin-1. IL-17 juga memiliki fungsi esensial yaitu bersinergi dengan sel T $CD4^+$ yang disebut T-helper 17 (Miossec dkk., 2009). Menurut Kryczek dkk., (2009), sel interleukin 17 (IL-17) dan sel Th 17 (Th17) berperan aktif dalam inflamasi dan penyakit autoimun pada sistem murine. Sel Th17 ditemukan pada tumor manusia. Ekspresi IL-17 pada sel tumor, akan menekan perkembangan tumor dengan peningkatan kekebalan anti-tumor pada sel imunokompeten.

Reseptor IL-17 (IL-17R) mulanya dideskripsikan berupa protein transmembran tipe I yang terdiri dari 293 domain asam amino ekstraseluler, 21 domain asam amino transmembran dan 525 panjang ekor asam amino sitoplasmik. Reseptor IL-17 diekspresikan secara luas di paru-paru, ginjal, hati dan limfa serta pada fibroblast terisolasi, sel epitel, sel mesothelial dan berbagai sel myeloid pada tikus dan Mencit. Namun pada sel manusia, sinyal RNA dari IL-17R dapat dideteksi pada sel epitel, fibroblast, limfosit B dan T, sel myelomonocytic dan sel sumsum stroma. Reseptor IL-17 itu sendiri

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

dapat dideteksi pada limfosit T darah perifer dan pada sel endotel vaskuler dari manusia (Jay & Linden, 2004).

IL-17 memberikan efek pro-inflamasi yang kuat dan telah muncul sebagai mediator penting dalam inflamasi. Level dari sel produksi IL-17 meningkat secara signifikan pada daerah tumor (Kryczek dkk., 2011). Menurut Liu dkk. (2011), IL-17^{+} dan Foxp3 pada manusia menyebabkan sitokin pro-inflamasi dan menekan fungsi sel T, menunjukkan dual fungsi yaitu inflamasi dan regulatori. Pengaturan inflamasi pada sel T diindikasi dari sel T memori CCR6^{+} dan sel T_{reg}, dimana keduanya berkontribusi untuk mempromosikan adanya peradangan aktif.



(Iwakura dkk., 2011)

Gambar 6. Peran IL-17A dan IL-17F

IL-17A dan IL-17F terlibat dalam pengembangan inflamasi dan pertahanan inang terhadap infeksi dengan cara menginduksi ekspresi gen yang mengkode sikotin pro-inflamasi seperti (TNF, IL-1,IL-6, G-CSF dan GM-CSF), kemokin (CXCL1, CXCL5,IL-8, CCL2 da CCL7), peptide antimikroba dan matriks metalloproteinase (MMP1,MMP3 dan MMP13) dari fibroblast, sel endotel dan sel

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

epitel. Mediator ini menginduksi perekrutan neutrofil di situs inflamasi, mempromosikan kerusakan jaringan lokal, mendorong neovaskularisasi pada tumor, meningkatkan osteoklastogenesis dan melindungi dari patogen yang dapat menyebabkan penyakit. IL-17A terlibat dalam pengembangan autoimunitas dan alergi, inflamasi, perkembangan tumor dan berperan penting dalam pertahanan inang melawan bakteri dan jamur, sedangkan IL-17F terlibat dalam mekanisme pertahanan inang melawan bakteri di mukosa dan pembengkakan pada jaringan epitel (Iwakura dkk., 2011).

2.9 Makrofag (CD11b)

CD11b merupakan anggota dari famili integrin yang berpasangan dengan CD18 untuk membentuk CR3 heteroditer. CD11b diekspresikan pada permukaan oleh beberapa leukosit seperti monosit, neutrofil, sel *Natural Killer* (NK), granulosit dan makrofag. CD11b berfungsi meregulasi *adhesion* leukosit dan migrasi untuk memediasi respon inflamatori. Antibodi monoklonal CD11b untuk mencegah perekrutan dari sel myeloid pada penderita tumor (Ahn dkk., 2010). CD11b merupakan sel integrin molekul adhesion yang diekspresikan pada jaringan di bagian regulasi migrasi transendotel dari sel ke dalam jaringan dan parenkim tumor (DeNardo dkk., 2011).

Integrin yang diketahui berperan penting dalam pergerakan sel. Sel-sel imun dari garis monosit menggunakan struktur *adhesive* spesifik untuk migrasi, disebut dengan podosome. Pergerakan intravaskuler dari monosit, dimana bergerak dalam matriks ekstraseluler setelah transmigrasi dan bergerak dari sel dendritik menuju lymph node (Ley dkk., 2007). Sel yang teraktivasi meninggalkan pembuluh darah dengan bantuan sinyal yang dimediasi oleh integrin dan melibatkan patogen yang menyerang. Untuk menangkap dan mengeliminasi target, fagositosit memanfaatkan berbagai reseptor di permukaan. Pola pengenalan reseptor dengan pola pengikatan patogen secara langsung, sementara target opsonized dikenali oleh reseptor *complement* dan Fc yang secara signifikan meningkatkan efisiensi fagositosis. Mediasi integrin juga dapat digunakan untuk masuk ke dalam sel inang. Monosit, makrofag dan granulosit neutrofil menunjukkan kapasitas

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

yang lebih tinggi untuk membunuh bakteri daripada sel dendritik (Dupuy & Caron, 2008).

Pertumbuhan tumor dikaitkan dengan aktivasi dari *bone marrow cells* (BMCs). *Bone marrow-derived cell* (BMDCs) mengikat angiogenesis dan pertumbuhan tumor. Peran BMCs tidak hanya untuk pertumbuhan tumor primer saja, tetapi juga pada metastasis (Kaplan dkk., 2006). BMCDs itu sendiri merupakan target sekaligus alat untuk terapi kanker (Wu dkk., 2009). Peran BMC dalam terapi kanker dapat ditinjau dalam pelemahan pertumbuhan sel tumor yang dapat dipulihkan dengan transplantasi BMC dimana $CD11b^+$ myeloid BMC merupakan populasi utama (Ahn & Brown, 2010). Tumor yang diberi sel $CD11b^+$ myeloid juga mendorong angiogenesis dengan mengekspresikan berbagai molekul proangiogenik (Laurent dkk., 2011).

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2017 sampai dengan Februari 2018, bertempat di Laboratorium Fisiologi, Struktur dan Perkembangan Hewan, Gedung Biologi Molekuler, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Deskripsi Hewan Coba

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan hewan coba yaitu Mencit betina (*Mus musculus*) dengan kriteria berat badan 25-30 gram dan berusia 7-8 minggu yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada (LPPT UGM), Yogyakarta. Aklimatisasi dilakukan selama 7 hari sebelum dilakukan perlakuan injeksi senyawa karsinogenik (DMBA). Perlakuan terhadap hewan coba telah sesuai dengan standar laik etik oleh Komite Etik Penelitian Universitas Brawijaya berdasarkan surat keterangan kelaikan etik No. 925-KEP-UB (Lampiran 1).

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan jenis penelitian *in vivo*. Mencit berjumlah 24 ekor yang dibagi menjadi enam kelompok perlakuan. Perlakuan kontrol negatif (sehat, K-), perlakuan kontrol positif (kanker, K+), perlakuan Cisplatin (CISP) dengan dosis 3 mg/kg, perlakuan kanker + ramuan Cheral dengan dosis 1,233 mg/kg BB (D1), perlakuan kanker + ramuan Cheral dengan dosis 2,466 mg/kg BB (D2) dan perlakuan kanker + ramuan Cheral dengan dosis 4,932 mg/kg BB (D3).

3.4 Induksi Kanker Payudara pada Mencit

Mencit betina sehat yang berusia 5 minggu diinduksi dengan senyawa karsinogenik DMBA (7,12-Dimethylbenz[A]Anthracene), (Tokyo Chemical Industry, Jepang). Pemberian dosis DMBA sesuai dengan metode Jayakumar dkk. (2014) dengan beberapa modifikasi.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Mencit betina sehat yang berusia 8 minggu ditimbang terlebih dahulu untuk mengetahui berat badannya yang dibutuhkan dalam penentuan dosis tiap individu Mencit. DMBA dilarutkan dengan minyak jagung 0,1 mL per ekor. Dosis DMBA yang diberikan yaitu 0,015 mg/g BB Mencit. Pemberian DMBA dilakukan pada bagian subkutan di daerah sekitar kelenjar mamae Mencit satu kali dalam seminggu yaitu pada minggu ke-1 hingga minggu ke-6. Setiap hari Mencit diamati apakah sudah nampak beberapa tanda bahwa Mencit tersebut telah terserang kanker payudara, seperti adanya benjolan berwarna kehitaman pada bagian kelenjar mamae Mencit dan rambut di sekitar bagian mamae Mencit terlihat rontok.

3.5 Pemberian Ramuan Cheral dan Cisplatin

Mencit betina yang telah diinduksi DMBA selama enam minggu dan dinyatakan telah mengalami kanker pada kelenjar mamae secara morfologi dan anatomi, maka Mencit tersebut diberi perlakuan ramuan Cheral dengan dosis yang berbeda-beda sesuai perlakuan. Perlakuan yang diberi ramuan Cheral adalah perlakuan 4 (P2), perlakuan 5 (P3) dan perlakuan 6 (P4) serta perlakuan yang diberi Cisplatin adalah perlakuan 3 (P1). Cheral yang digunakan adalah campuran dari Meniran dan Temu Putih dengan PBS sebagai pelarut. Pemberian ekstrak Cheral dilakukan secara oral setiap hari selama 14 hari. Pemberian Cisplatin (PT. Dankos Farma, INA) yang telah dilarutkan dengan PBS dilakukan injeksi secara intraperitoneal sebanyak 7 kali dalam 14 hari dengan dosis 3 mg/kg (Chen dkk., 2015). Dosis untuk perlakuan dosis ramuan Cheral meliputi 1,233 mg/kg BB (D1), kanker dengan perlakuan dosis ramuan Cheral 2,466 mg/kg BB (D2) dan kanker dengan perlakuan dosis ramuan Cheral 4,932 mg/kg BB (D3).

3.6 Isolasi Organ Limfa dan Perhitungan Sel

Mencit yang telah 14 hari diberi perlakuan ramuan Cheral dan Cisplatin, maka Mencit didislokasi pada bagian leher. Mencit diletakkan terlentang pada papan bedah kemudian disemprotkan alkohol 70 % pada bagian ventral. Bagian kulit ditarik dan digunting hingga terlihat bagian organ dalam Mencit. Organ limfa yang terletak di belakang lambung diambil dan dicuci dengan larutan PBS. Organ

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

limfa diisolasi dan dicuci dengan larutan PBS. Organ Limfa dihaluskan dengan menggunakan pangkal spuit searah jarum jam hingga homogen. Homogenat diambil menggunakan mikropipet tanpa debris dan dimasukkan dalam tabung propilen dan ditambahkan PBS hingga volume 6 mL. Setelah semua suspensi sel dipindahkan, tabung propilen tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm, suhu 10 ^{0}C selama 5 menit. Hasil sentrifugasi, supernatan dibuang, kemudian pelet diambil dan ditambahkan 1 mL PBS lalu diresuspensi. Hasil resuspensi tersebut diambil sebanyak 5 µL, ditambahkan dengan 95 µL pewarna *Evans Blue* dan homogenkan. Jumlah sel kemudian dihitung dengan hemositometer menggunakan mikroskop pada perbesaran 400x.

3.7 Prosedur Analisis Jumlah Relatif IL-17, TNF-α, IFN-γ dengan *Flowcytometry*

Pewarnaan antibodi terdiri dari dua macam yaitu pewarnaan ekstraseluler dan intraseluler. Pewarnaan ekstraseluler diawali dengan sisa resuspensi pada penghitungan sel diambil dan dibagi pada 5 *microtube*. Masing-masing sampel 150 µL yang telah berisi 350 µL larutan PBS. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 5 menit suhu 10 ºC. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang. Pelet hasil sentrifugasi diambil dan ditambahkan 1 µL antibodi yaitu anti-CD11b dan anti-CD4 (BDBioscience, AS) (untuk pewarnaan ekstraseluler) yang telah diencerkan dengan 50 µL PBS. Lalu diinkubasi selama 20 menit pada suhu es di ruang gelap. PBS ditambahkan sebanyak 400 µL, sampel dimasukkan dalam kuvet *flowcytometry* dan dilakukan pengukuran menggunakan flowsitometer (BD FACSCalibur, AS).

Pewarnaan intraseluler diawali dengan 4 *microtube* yang berisi pelet dan PBS 400 µL diinkubasi. Larutan cytofix 50 µL ditambahkan pada *microtube* dan diinkubasi beberapa menit. Larutan *washperm* 500 µL ditambahkan ke dalam *microtube*. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit pada suhu 10 ºC. Masing-masing *microtube* ditambahkan antibodi yaitu anti-TNF-α, anti-IFN-γ dan anti-IL-17 (BDBioscience, AS) lalu diinkubasi selama 20 menit. PBS 400 µL ditambahkan ke masing-masing *microtube*, kemudian dimasukkan dalam kuvet *flow*

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

cytometry dan dilakukan pengukuran menggunakan flowsitometer (BD FACSCalibur, AS).

3.8 Analisis Data

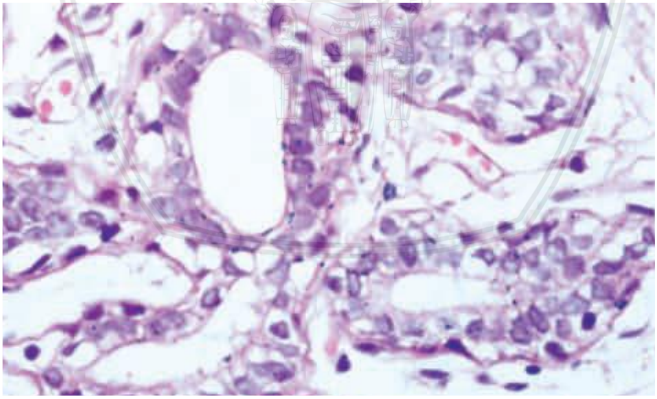
Hail pengukuran menggunakan flowsitometri dianalisis dengan menggunakan *software* BD Cellquest Pro^{TM}. Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan software SPSS uji *one-way* ANOVA dengan nilai signifikansi 95% dilanjutkan dengan uji Tukey *Honestly Significant Difference* (HSD) untuk mengetahui beda signifikansi antar perlakuan.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kondisi Mencit Setelah Diinduksi DMBA

Mikroanatomi payudara memiliki 2 jenis komponen jaringan: epitel dan stroma. Komponen epitel mengisi kurang lebih 10% dari volume total payudara. Komponen epitel payudara terdiri dari 2 bagian utama yaitu *terminal duct-lobular unit* (TDLU) (Gambar 7) yang berfungsi sebagai sekretorik utama selama laktasi dan *large duct system* yang berperan dalam pengumpulan dan sekresi. Payudara memiliki sekitar 20 lobus, yang setiap lobusnya terdiri dari lobus payudara yang mengalirkan sekresi melalui sistem duktus. Pada bagian duktus terdapat bagian yang disebut duktus laktiferus, letaknya di bawah puting dan bagian yang menunjukkan dilatasi kecil disebut sinus laktiferus. Setiap duktus laktiferus memiliki sistem duktusnya sendiri dengan memiliki cabang berdiameter lebih kecil dan pada akhirnya berakhir pada bagian perifer sebagai duktus terminal di lobulus payudara. Seluruh sistem epitel duktus-lobular memiliki lapisan *bilayered*: epitel bagian dalam yang berfungsi sebagai sekretorik dan absorpsi dan lapisan pendukung myoepitheial luar (Mohan, 2010).



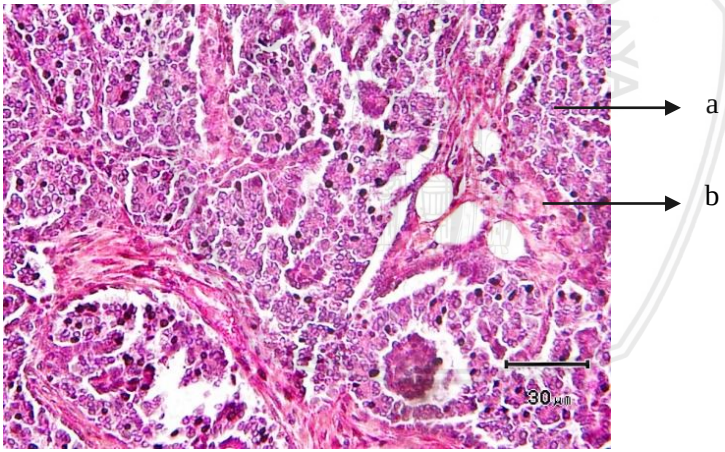
(Mohan, 2010)

Gambar 7. Normal *terminal duct-lobular unit* (TDLU) pada lobus payudara.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Bagian stroma payudara terdiri dari sejumlah jaringan ikat longgar dan jaringan adiposa. Jaringan stroma terdapat di 2 lokasi: stroma intralobular dan interlobular. Stroma intralobular menutup setiap lobus, asinus, duktus, bagian yang tersusun atas jaringan ikat longgar, stroma myxomatous dan limfosit yang tersebar. Stroma interlobular memisahkan satu lobus dari yang lain, terutama bagian yang terdiri dari jaringan adiposa dan beberapa jaringan ikat longgar (Mohan, 2010).

Pengamatan kondisi hewan coba setelah diinduksi kanker dengan DMBA dilakukan untuk mengetahui apakah hewan coba tersebut telah terserang kanker payudara atau belum. Pengamatan dilakukan secara morfologi yang ditandai dengan adanya benjolan berwarna kehitaman pada bagian kelenjar mamae Mencit dan rambut di sekitar bagian mamae Mencit terlihat rontok. Selain itu juga dilakukan pengamatan secara histopatologi untuk mengkonfirmasi bahwa hewan coba benar-benar mengalami kanker payudara dengan pembuatan preparat histologi (Gambar 8).



Gambar 8. Histologi kanker payudara Mencit setelah diinduksi dengan DMBA (Perbesaran 400x). Keterangan: (a) sel karsinoma, (b) jaringan ikat

Preparat histologi menunjukkan bagian duktus pada mamae Mencit mengalami perubahan dimana sel-sel epitel mulai menyebar

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

tidak beraturan keluar dari duktus. Menurut Hunt (2009), karsinoma *invasive*, menunjukkan ciri-ciri membran basal akan mengalami rusak sebagian atau secara keseluruhan dan sel kanker akan mampu menginvasi jaringan di sekitarnya sehingga menjadi sel metastatik. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa hewan coba telah mengalami karsinoma *invasive*.

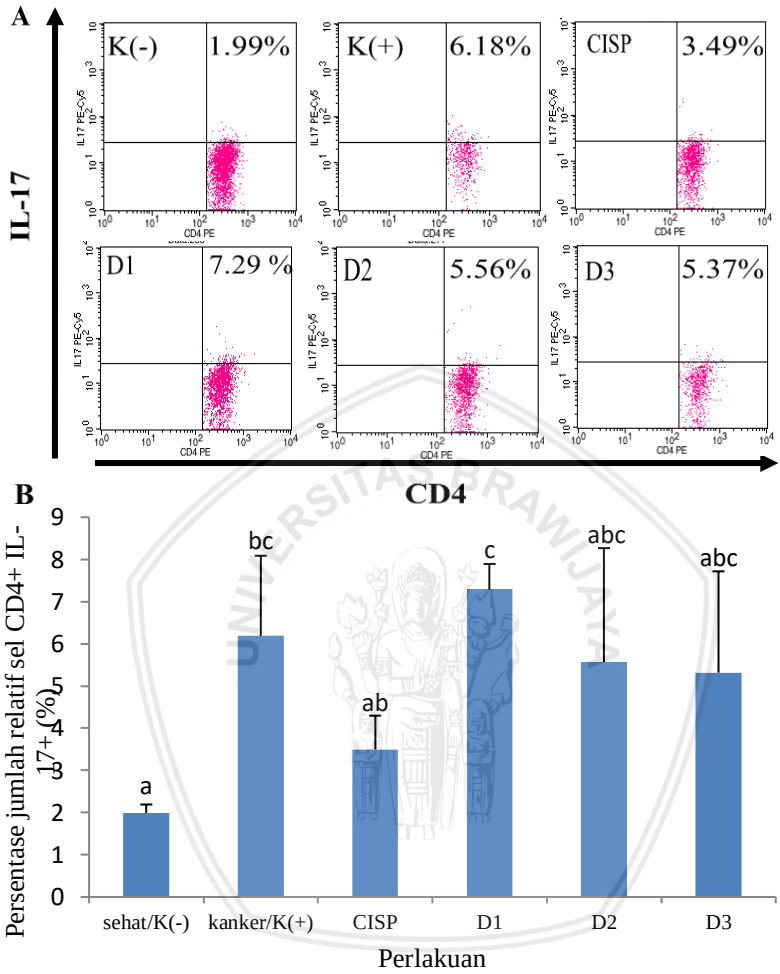
4.2 Jumlah Relatif Sel $CD4^{+}IL\text{-}17^{+}$ dan Makrofag $CD11b^{+}IL\text{-}17^{+}$

Berdasarkan hasil analisis statistik pada Gambar 9B dan 10B, bahwa pada kondisi kanker (K+) menunjukkan adanya peningkatan jumlah relatif sel T CD4 dan makrofag yang mengekspresi IL-17 dari kondisi sehat (K-). Peningkatan IL-17 pada sel T CD4 dan makrofag pada kondisi kanker dikarenakan adanya mekanisme dari senyawa DMBA yang dapat menyebabkan tumorgenesis pada jaringan, sehingga jaringan tersebut banyak memproduksi sitokin pro-inflamasi IL-17. Senyawa DMBA dalam tubuh akan berikatan dengan sitokrom P-450 dan membentuk ikatan kovalen dengan DNA sehingga dapat menyebabkan DNA *adduct* dan menyebabkan kerusakan oksidatif pada sel (Page dkk., 2002). Mencit yang mengalami kanker payudara akan mengalami pengingkatan (*Reactive oxygen Species*) ROS yang dapat memuci aktivasi NF-κB. Teraktivasinya NF-κB yang merupakan faktor transkripsi dari gen yang terlibat dalam sistem imun untuk memproduksi sitokin dan kemokin pro-inflamasi (Lin & Karin, 2007). Adanya peningkatan jumlah relatif sel T CD4 yang mengekspresi IL-17 pada organ limfa menunjukkan bahwa hewan coba telah mengalami kanker yang ditandai dengan meningkatnya produksi sitokin pro-inflamasi, dimana sitokin tersebut mempromosikan bagian inflamasi pada jaringan yang terkena kanker. Salah satu sitokin pro-inflamasi yang banyak diproduksi saat terjadi inflamasi adalah IL-17. Menurut Welte & Zhang (2015), IL-17 sebagai pemicu potensial sel T yang memediasi respon imun dengan menginduksi ekspresi kemokin dan VEGF untuk mengaktifkan dan merekrut sel dendritik, monosit dan neutrofil dalam berbagai jaringan yang terjadi inflamasi. Selain itu peningkatan IL-17 pada perlakuan K+ sesuai dengan pernyataan Kryczek dkk., (2011), dimana level dari sel yang memproduksi IL-17 meningkat secara signifikan pada daerah tumor.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Sel T $CD4^{+}IL\text{-}17^{+}$ adalah sel T yang mengekspresikan sitokin pro-inflamasi IL-17. Sel Th17 merupakan salah satu subset dari sel CD4 yang mampu memproduksi sitokin pro-inflamasi IL-17 (Iwakura dkk., 2011). Berdasarkan hasil penelitian baik pada perlakuan kelompok dosis Cheral (D2 dan D3) maupun Cisplatin menunjukkan adanya penurunan IL-17 yang diproduksi oleh sel T CD4 pada organ limfa Mencit model kanker payudara jika dibandingkan dengan perlakuan kanker tanpa perlakuan (K+). Penurunan jumlah relatif sel T $CD^{+}IL\text{-}17^{+}$ pada perlakuan kelompok dosis Cheral dan Cisplatin menunjukkan tidak adanya perbedaan secara signifikan ($\rho>0.05$). Penurunan jumlah relatif sel Th17 yang mengekspresi IL-17 yang ditunjukkan oleh perlakuan kelompok dosis Cheral (D2 dan D3) tidak lebih baik dari hasil penurunan jumlah relatif sel T CD4 yang mengekspresi IL-17 yang ditunjukkan pada perlakuan kelompok Cisplatin. Secara tren data penurunan IL-17 pada perlakuan kelompok Cisplatin menunjukkan jumlah IL-17 yang mendekati keadaan sehat (Gambar 8). Cisplatin memiliki atom platinum yang akan berikatan dengan DNA target dengan bantuan faktor transkripsi *Aryl hydrocarbon receptor* (AhR) (Desoize & Madoulet, 2002). Ligan AhR yang teraktivasi akan berpindah ke nukleus dengan ko-faktor ARNT. Kompleks AhR yang diaktifkan kemudian akan berikatan pada bagian yang mengenal DNA tertentu di bagian gen yang responsif terhadap AhR dan menginduksi transkripsi gen yang menyebabkan DNA menjadi *adduct* yang kemudian dapat memicu terjadinya apoptosis pada sel tersebut (Currier dkk., 2005). Cisplatin dapat menginduksi produksi ROS yang tinggi sehingga dapat memicu terjadinya stres oksidatif dan kematian sel (Dasary & Tchounwou, 2014). Melalui mekasnisme tersebut, perlakuan kelompok dosis Cisplatin mengalami penurunan jumlah relatif sel T CD4 dan makrofag dalam ekspresi IL-17.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



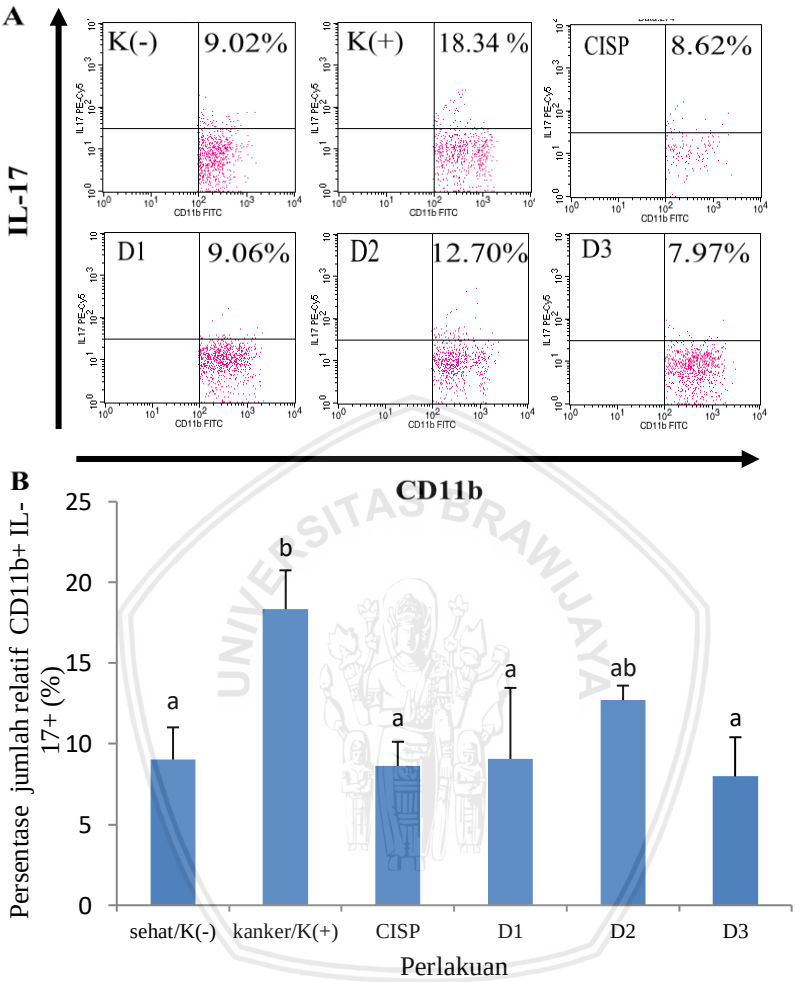
Gambar 9. Rerata penurunan jumlah relatif sel T $CD4^{+}IL\text{-}17^{+}$ pada kelompok perlakuan dosis Cheral dan Cisplatin. (A) *DotPlot* hasil analisis *flow cytometry*, (B) histogram hasil uji statistik. Keterangan: K- kontrol sehat,K+= kontrol kanker, CISP= kanker+Cisplatin, D1= kanker+dosis 1,233 mg/kg BB, D2= kanker+dosis 2,466 mg/kg BB, D3= kanker+dosis 4,932 mg/kg BB.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Parameter $CD11b^{+}IL\text{-}17^{+}$ menunjukkan sel makrofag yang mengekpresikan sitokin pro-inflamasi IL-17. Berdasarkan hasil analisis statistik jumlah relatif CD11b yang mengekspresikan IL-17 ($CD11b^{+}IL\text{-}17^{+}$) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($\rho < 0.05$) antara kondisi kanker dengan perlakuan baik dosis Cheral dan Cisplatin, kecuali pada kelompok perlakuan dosis Cheral D2. Secara tren data perlakuan dosis D3 memiliki khasiat paling baik dalam menurunkan IL-17 pada makrofag dibandingkan dengan dosis lain.

Sitokin pro-inflamasi seperti TNF-α, IL-6 dan IL-10 dapat menginduksi pertumbuhan tumor dalam kondisi spesifik (Bhatelia & Singh, 2014). Induksi sementara IL-6 oleh monosit yang diturunkan MCP-1 baru-baru ini telah dilaporkan untuk mendorong pensinyalan jalur kaskade inflamasi yang mengarah ke produksi IL-6 dan transformasi sel kanker payudara serta tumorgenesis (Rokavec et al., 2012), IL-6 mampu meningkatkan perekrutan sel-sel induk mesenchymal yang berasal dari sumsum tulang belakang (MSCs) ke situs-situs tumor payudara yang tumbuh serta memproduksi CXCL7 dalam MSC, yang mempromosikan proliferasi dari populasi CSC payudara (Liu dkk., 2011). IL-6 dan TGFβ merupakan sitokin kunci sebagai inisiasi differensiasi sel Th17 yang dibantu dengan faktor transkripsi RORγt untuk mengekspresikan IL-17 (Noack & Miossec, 2014). Adanya overekspresi dari sitokin IL-17 pada sel tumor dapat menyebabkan perubahan lingkungan mikro tumor sehingga tumor dapat bersifat lebih *invasive* dan metastatik serta dapat menekan respon anti-tumor (Welte & Zhang, 2015). IL-17 dapat menstimulasi produksi TNF-α dan IL-1 oleh sel monosit dan makrofag sehingga dapat meningkatkan produksi MMP9 dari makrofag (Zhu dkk., 2008).

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Gambar 10. Rerata penurunan jumlah relatif $CD11b^{+}IL\text{-}17^{+}$ pada kelompok perlakuan dosis Cheral dan Cisplatin. (A) *DotPlot* hasil analisis *flow cytometry*, (B) histogram hasil uji statistik. Keterangan: K- kontrol sehat,K+= kontrol kanker, CISP= kanker+Cisplatin, D1= kanker+dosis 1,233 mg/kg BB, D2= kanker+dosis 2,466 mg/kg BB, D3= kanker+dosis 4,932 mg/kg BB.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Kondisi normal jumlah antara sel-sel imun dalam tubuh harus seimbang dengan jumlah sel spesifik pada kelenjar payudara. Adanya disregulasi dari keseimbangan tersebut dapat memicu terjadinya inflamasi kronis. Peningkatan jumlah *tumor associated macrophages* (TAMs) diamati pada jaringan kanker payudara karena makrofag berperan melindungi *host* terhadap kondisi sakit dan memfasilitasi lolosnya sel tumor dari sistem imun (Bhatelia & Singh, 2014). TAMs muncul dari monosit yang bersirkulasi yang bermigrasi ke jaringan tumor dan berdiferensiasi menjadi makrofag. Sistem imun pada lingkungan mikro tumor dapat memandu diferensiasi makrofag menjadi dua subset utama biasanya disebut sebagai tipe M1 pro-inflamasi dan tipe M2 anti-inflamasi. TAM M2 mampu mempromosikan angiogenesis dan meningkatkan potensi metastatik tumor. Polarisasi lingkungan mikro tumor juga tergantung pada keseimbangan antara penekanan kekebalan (IL6, IL10, TGFb) dan penekanan tumor (IL-12, IFN-c, TNFa) (Dieci dkk., 2016).

Pemberian ramuan Cheral dapat memperbaiki sistem imunitas tubuh dalam melawan kanker sehingga produksi sitokin pro-inflamasi IL-17 tidak lagi dibutuhkan tubuh dalam jumlah yang banyak. Hal tersebut ditunjukkan dengan turunnya jumlah relatif sel T dan makrofag yang mensekresi sitokin IL-17 pada perlakuan kelompok dosis Cheral. Penurunan jumlah relatif sel T CD4 dan makrofag yang mensekresi sitokin IL-17 pada perlakuan kelompok dosis Cheral dikarenakan ramuan Cheral yang terdiri dari tanaman Meniran dan rimpang Temu Putih memiliki kandungan antioksidan polifenol dan flavonoid yang baik dalam mengurangi aktivitas radikal (Mau dkk., 2003) dan memiliki aktivitas anti-inflamasi, anti-tumor dan antihepatotoksik. Selain itu ekstrak dari Meniran pada kisaran konsentrasi (100 g/mL) dapat menghambat aktivator plasminogen jenis urokinase dan aktivitas enzim MMP-2 dan dapat menghambat fosforilasi ERK1/2 (Lu dkk., 2013). Kandungan senyawa curcumin pada Temu Putih berfungi sebagai antioksidan, anti-inflamasi dan anti-karsinogenik. Selain itu curcumin secara signifikan dapat menghambat pertumbuhan sel pre-kanker dan karsinoma(Li dkk., 2002).

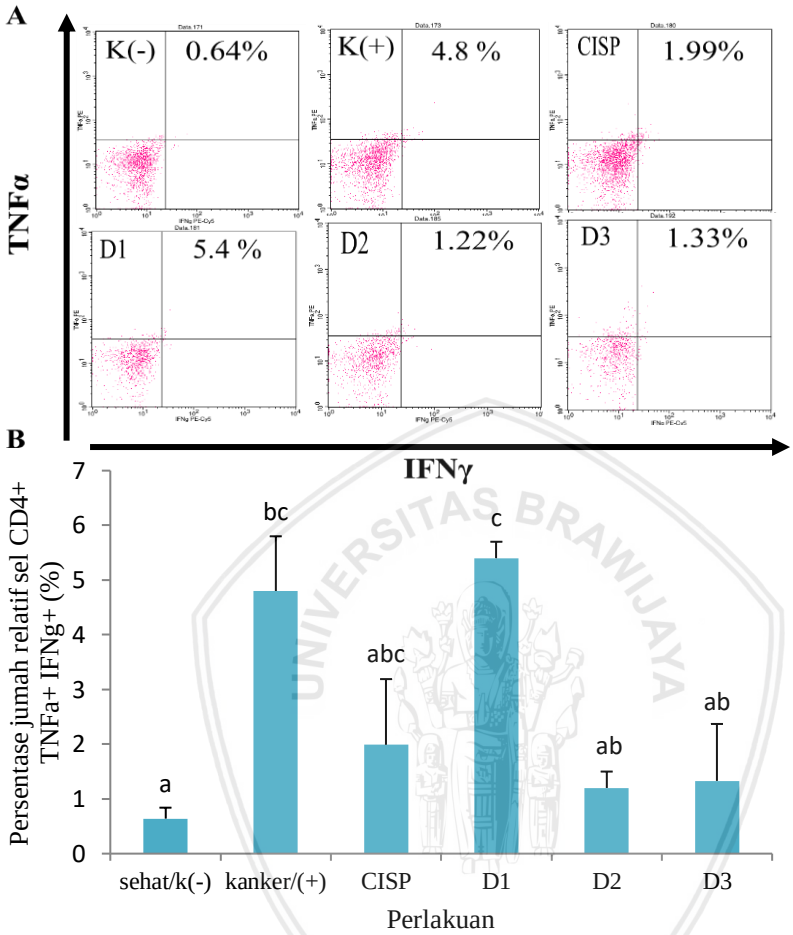
repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

4.3 Jumlah Relatif Sel $CD4^+TNF\text{-}\alpha^+IFN\text{-}\gamma^+$

Hasil penelitian menunjukkan baik pada perlakuan kelompok dosis CISP dan Cheral, kecuali pada perlakuan D1 mampu menurunkan jumlah relatif sel T CD4 yang mengekspresi sitokin pro-inflamasi $TNF\text{-}\alpha^+IFN\text{-}\gamma^{+\cdot}$. Didukung dengan hasil analisis statistik seperti pada Gambar 11B, bahwa pada kondisi kanker (K+) menunjukkan adanya peningkatan jumlah relatif sel T CD4 yang mengekspresi sitokin $TNF\text{-}\alpha^+IFN\text{-}\gamma^+$ dari kondisi sehat (K-). Mencit yang mengalami kanker payudara akan mengalami pengingkatan (*Reactive oxygen Species*) ROS yang dapat memuci aktivasi NF-κB. Teraktivasinya NF-κB yang merupakan faktor transkripsi dari gen yang terlibat dalam sistem imun untuk memproduksi sitokin dan kemokin pro-inflamasi (Lin & Karin, 2007). Adanya peningkatan jumlah relatif sel T CD4 yang mengekspresi sitokin $TNF\text{-}\alpha^+IFN\text{-}\gamma^+$ pada organ limfa menunjukkan bahwa hewan coba telah mengalami kanker ditandai dengan meningkatnya produksi sitokin pro-inflamasi, sitokin tersebut mempromosikan bagian inflamasi pada jaringan yang terkena kanker. Salah satu sitokin pro-inflamasi yang banyak diproduksi saat terjadi inflamasi adalah $TNF\text{-}\alpha^+IFN\text{-}\gamma^+$. Adanya interaksi TLR di lingkungan mikro tumor menginduksi peristiwa pensinyalan yang mengaktifkan faktor transkripsi IRF atau NF-κB yang memainkan peran penting dalam sistem imun bawaan. Peran tersebut juga memicu terekspresinya beberapa sitokin dan kemokin pro-inflamasi. Adanya sitokin pro-inflamasi yang berlebihan dapat mendukung proses angiogenesis dan migrasi sel yang mendukung pertumbuhan tumor (Bhatelia & Singh, 2014).

Parameter $CD4^+TNF\text{-}\alpha^+IFN\text{-}\gamma^+$ merupakan sel T CD4 yang mengekspresikan sitokin pro-inflamasi. Menurut Lin & Karin(2007), TNF-α diproduksi di lingkungan mikro tumor oleh sel-sel tumor atau sel-sel yang mengalami inflamasi. Berdasarkan hasil penelitian baik pada perlakuan kelompok dosis Cheral (D2 dan D3) maupun CISP menunjukkan adanya penurunan jumlah relatif sel T CD4 yang mengekspresi sitokin TNF-α dan IFN-γ pada organ limfa Mencit model kanker payudara jika dibandingkan dengan perlakuan kanker tanpa perlakuan (K+).

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Gambar 11. Rerata penurunan jumlah relatif sel T $CD4^{+}TNF\text{-}\alpha^{+}$ pada kelompok perlakuan dosis Cheral dan Cisplatin. (A) *DotPlot* hasil analisis *flowcytometry*, (B) Histogram hasil uji statistik. Keterangan: K- kontrol sehat,K+= kontrol kanker, CISP= kanker+Cisplatin, D1= kanker+dosis 1,233 mg/kg BB, D2= kanker+dosis 2,466 mg/kg BB, D3= kanker+dosis 4,932 mg/kg BB.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Penurunan jumlah relatif sel T CD4 yang mengekspresikan sitokin TNF-α pada perlakuan kelompok dosis Cheral dan CISP menunjukkan tidak adanya perbedaan secara signifikan ($\rho>0.05$). Secara tren data penurunan jumlah relatif sel T CD4 yang mengekspresi sitokin TNF-α dan IFN-γ paling baik terjadi pada perlakuan kelompok dosis Cheral D2 dan D3 yang menunjukkan hasil hampir sama dengan keadaan sehat (Gambar 11). Cisplatin dapat menginduksi produksi ROS yang tinggi sehingga dapat memicu terjadinya stres oksidatif dan kematian sel (Dasary & Tchounwou, 2014). Melalui mekasnisme tersebut, perlakuan kelompok dosis Cisplatin mengalami penurunan jumlah relatif sel T CD4 dalam ekspresi sitokin TNF-α dan IFN-γ.

Pada mesothelioma ganas manusia yang diinduksi fagositosis makrofag kemudian akan melepaskan TNF-α. TNF-α mampu meningkatkan kelangsungan hidup sel dengan demikian dapat mengurangi sitotoksisitas yang diinduksi abses dan dapat meningkatkan kumpulan sel mesothelium yang rusak karena abses yang rentan terhadap transformasi malignan. TNF-α juga berkontribusi pada inisiasi tumor dengan merangsang produksi molekul genotoksik, yaitu molekul yang dapat menyebabkan kerusakan dan mutasi DNA, seperti NO dan ROS (4). Polimorfisme genetik yang meningkatkan produksi TNF-α berhubungan dengan peningkatan risiko kanker kandung kemih, kanker hepatoseluler (HCC), kanker lambung dan kanker payudara serta prognosis buruk dalam berbagai keganasan hematologi. Fungsi lain dari TNF-α dapat meningkatkan perkembangan tumor, yang bertentangan dengan inisiasi tumor, termasuk promosi angiogenesis dan metastasis, serta gangguan pengawasan kekebalan dengan sangat menekan banyak tanggapan aktivitas sel T sitotoksik yang diaktifkan makrofag (Lin & Karin, 2007).

Diproduksinya TNF-α akan meningkatkan produksi CXCL1/2 oleh sel tumor melalui aktivasi NF-κB. Sel-sel tersebut akan melepaskan protein yang merupakan modulator inflamasi yang dapat mengaktifkan protein p70S6K dan *signaling pathway* ERK1/2 sehingga memberikan keuntungan bagi kelangsungan hidup sel tumor primer dan metastasis sel (Jiang & Shapiro, 2014). ILs, TNF-α, dan IFN-γ adalah regulator utama fungsi kekebalan tubuh, respon inflamasi dan banyak kegiatan fisiologis atau patologis lainnya.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Sitokin ini secara kolektif memberi sinyal melalui Jalur Jak/STAT dan jalur NF-κB untuk mengatur berbagai aspek kelangsungan hidup sel, proliferasi dan diferensiasi. Ketika ILs dan IFN-γ mengikat reseptor kognitif mereka, Jak Kinase menjadi aktif dan memfosforilasi protein STAT, yang memungkinkan terjadinya dimerisasi STAT dan translokasi nukleus. Protein NF-κB, termasuk p50, p52, RelA/ p65 dan RelB berperan sebagai dimer dan biasanya disimpan dalam keadaan tidak aktif oleh protein IκB. Rangsangan ekstraseluler seperti tersekresinya TNFa dapat memicu degradasi IκB sehingga membebaskan kompleks NF-kB. Protein NF-κB yang aktif memasuki nukleus seperti STAT, berfungsi sebagai faktor transkripsi untuk mengatur berbagai macam gen target yang terlibat dalam proses tersebut. TGF-β, dengan fungsinya yang beragam dan penting dalam sistem kekebalan tubuh, salah satunya berperan dalam banyak peristiwa pensinyalan ILs, TNF-α dan IFN-γ. TGF-β mengatur bioavailabilitas sitokin-sitokin ini serta transduksi sinyal mereka. Pada gilirannya, aktivitas TGF-β dimodulasi oleh faktor-faktor ini dalam berbagai cara (Guo & Wang, 2009). TNF-α berikatan dengan 2 reseptor yaitu TNFR1 dan TNFR2, untuk menginduksi kaskade pensinyalan yang menginduksi regulasi transkripsi dari mediator yang merupakan kunci untuk kelangsungan hidup sel, invasi, angiogenesis dan gangguan pengawasan sistem imun di tumor. TNFR1 merupakan reseptor mediator utama dari aksi-aksi TNF-α dalam mempromosikan tumor (Vasiliadou & Holen, 2013).

Penurunan jumlah relatif sel makrofag yang mensekresi sitokin pro-inflamasi TNF-α^+IFN-γ^+ pada perlakuan kelompok dosis Cheral terjadi karenakan ramuan Cheral yang terdiri dari Meniran memiliki kandungan antioksidan polifenol dan flavonoid yang baik dalam mengurangi aktivitas radikal (Mau dkk., 2003) dan Temu Putih yang mengandung terpenoid, alkaloid, saponin, flavonoid, fenolik, tannin dan curcumin memiliki aktivitas anti-inflamasi dan anti-tumor, aktivitas tersebut tidak memberikan efek sitotoksik pada sel normal dan efek anti-kanker lebih spesifik pada sel tumor (Huang dkk., 2002). Polifenol yang terkandung dalam Cheral dapat menghambat produksi dari sitokin TNF-α dan IFN-γ.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pada keadaan kanker payudara sistem imun memiliki level sitokin pro-inflamasi (IL-17, TNF-α^+, IFN-γ^+) yang tinggi pada organ limfa. Pemberian ramuan Cheral dapat digunakan sebagai terapi alternatif untuk menurunkan jumlah relatif dari sel T CD4 dan makrofag yang mengekspresikan sitokin pro-inflamasi (IL-17, TNF-α^+, IFN-γ^+) pada Mencit model kanker payudara sebagai upaya kompensasi sistem imun dalam melawan kanker.

5.2 Saran

Perlu dilakukan pembuatan preparat histologi pada mamae Mencit setelah diterapi dengan ramuan Cheral agar dapat dibandingkan kondisi histologi mamae Mencit saat keadaan kanker dan keadaan setelah diterapi.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

DAFRTAR PUSTAKA

Ahn, G.N., D. Tseng, C.H. Liao, A. Czechowicz & J.M. Brown. 2010. Inhibition of Mac-1 (CD11b/CD18) enhances tumor response to radiation by reducing myeloid cell recuitment. *PNAS*. 107(18): 8363-8368.

Allison, Jim. 2012. Plant life of the monastery of the holy spirit. www.Jimbotany.com. Diakses 21 Oktober 2017.

Anderson, W.F. 2000. gene therapy scores against cancer. *Nature Med*. 6(8): 862-86.

Bauer, K. R., M. Brwon, R. D. Cress, C. A. Parise & V. Caggiano. 2007. Descriptive analysis of esterogen reseptor (er)-negative, progesterone receptor (PR)-Negative, and HER2-Negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the california cancer registry. *Cancer*. 109 (9): 1721-1728.

Bhatelia, K., K. Singh. 2014. TLRs: Lingking information and breast cancer. *Cellular Signalling* 26: 2350-2357.

Chang, J.C., C.C. Lin, S.J. Wu, D.L. Lin, S.S. Wang, C.L. Miaw & L.T. Ng. 2008. Antioxidative and hepatoprotective effects of *physalis peruviana* extract against acetaminophen-induced liver injury in rats. *Pharmaceutical Biology*. 46(10): 724-731.

Chen, Y., F. Han, L. Cao, C. Li, J. Wang, Q.Li, W. Zheng, Z. Guo, A. Li, & J. Zhou. 2015. Dose-response relationship in cisplatin-treated breast cancer xenografts monitored with dynamic contrast-enhanced ultrasound. *BMC Cancer*. 15: 136.

Cheng, I.N., C.C. Chang, C.C. Ng, C.Y. Wang, Y.T. Shyu & T.L. Chang. 2008. Antioxidant and antimicrobial activity of *zingiberaceae* plants in taiwan. *Plant Food for Human Nutrition*. 64(1): 15-20.

Chunyan, G.T., S. Loi, S. Garaud, C. Equeter, M. Libin, A. D. Wind, M. Ravoet, H. L. Buanec, C. Sibille, G.M. Foutsop, I. Veys, B.H. Kains, S.K. Singhai, S. Michiels, F. Rothe, R. Salgado, H. Duviller, M. Ignatiadis, C. Desmedt, D. Bron, D. Larsimont, M. Piccart, C. Sotirou & K.W. Gallo. 2013. $CD4^+$ follicular helper t cell infiltration predicts breast cencer survival. *Clinical Investigation*. 123(70: 2873-2892.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

Currier, N., S. E. Solomon, E. G. Demicco, D. L. F. Chang, M. Farago, H. Ying, I. Dominguez, G. E. Sonenshein, R. D. Cardiff, Z. J. Xiao, D. H. Sherr & D. C. Seldin. 2005. Oncogenic signaling pathways activated in DMBA-induced mouse mammary tumors. *Toxicologic Pathology*. 33: 726-737.

Dasary, S. & P.B. Tchounwou. 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *J Pharmacol*. 5: 364-378.

DeNardo, D.G., D.J. Brennan, E. rexhepaj, B. Ruffell, S.L. Shiao, S.F. Madden, W.M. Gallagher, N. Wadhwani, S.D. Keil, S.A. Junaid, H.S. Rugo, E.S. Hwang, K. Jirstrom, B.L. West & L.M. Coussens. 2011. Leucocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *American Association for Cancer Research*. 1: 54-67.

Desoize, B & C. Madoulet. 2002. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Critical Review in Oncology/Hematology*. 42:317-325.

Dieci, M.V., G. Griguolo, F. Miglietta & V. Guarneri. 2016. The immune system and hormone-receptor positive breast cancer: Is it really a dead end?. *Cancer Treatment Review* 46: 9-19.

Eun-Yi, M., R. Yun-Kyoung & L. Geun-Hee. 2014. Dexamethasone inhibits in vivo tumor growth by the alteration of bone marrow $CD11b^{+}$ myeloid cells. *International Immunopharmacology* 21: 494-500.

Feurtes, Miguel A., C. Alonso and Jose. M. Perez. 2002. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action:enhancement of anti-tumor activity and circumvention of drug resistance. *Chemical Review*. 103(3): 645-660.

Galluzzi, L., L. Senovilla, I. Vitale, J. Michels, I. Martins, O. Kepp, M. Cstedo & G. Kroemer. 2012. Molecular mechanisms of Cisplatin resistance. *Oncogene*. 31: 1869-1883.

Guo, X. & X.F. Wang. 2009. Signalling cross-talk between TGF-β/BMP and another pathways. *Cell Research* 19:17-88.

Himaja, M., A. Ranjitha, M.V. Ramana, M. Anand, K. A. 2010. Phytochemical screening and antioxidant activity of rhizome part of *curcuma zedoaria*. *Research in Ayurveda and Pharmacy*. 1(2): 414-417.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

Huang, S.T., R.C. Yang, L.J. Yang, P.N. Lee & J.H. S Pang. 2002. *Phyllanthus urinaria* triggers the apoptosis and bcl-2 down-regulation in lewis lung carcinoma cell. *Life Sciences*. 72: 1705-1716.

Iwakura, Y., H. Ishigame, S. Saijo & S. Nakae. 2011. Functional specialization of interleukin-17 family member. Immunity. Vol. 34.

Janeway, C.A., Paul T., Mark W., Mark S. 2001. **Immunology: the immune system in health and disease: 5th Edition.** Taylor & Francis Inc. UK.

Jay, K. K. & A. Linden. 2004. Interleukin-17 family member and inflamation. *Immunity*. Vol 21(4): 467-476.

Jayakumar, J. K., P. Nirmala, B. A. P. Kumar & A. P. Kumar. 2014. Evaluation of protective effect of myricetin, a bioflavonoid in dimethyl benzathracene-induced breast cancer in female Wistar rats. *South Asian J Cancer*. 3(2): 107-111.

Jiang, Xinguo & D.J. Shapiro. 2014. The immune system and inflammation in breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology* 382: 673-682.

Kaplan, R.N., B. Psaila, D. Lyden. 2006. Bone marrow cell in the "pre-metatic niche": within bone and beyond. *Cancer*. 25: 521-529.

Kementrian Kesehatan RI. 2013. **Riset kesehatan dasar.** Badan Litbang Kemenkes RI. Jakarta.

Kryczek, I., S. Wei, W. Szeliga, L. Vatan & W. Zou. 2009. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Immunology*. 114(2): 357-359.

Kryczek, I., K. Wu, E. Zhao, S. Wei, L. Vatan, W. Szeliga, E. Huang, J. Greenson, A. Chang, J. Rolinski, P. Radwan, J. Fang, G. Wang & W. Zou. 2011. IL-17^{+} Regulatory T cell in the microenvironments of chronic inflammation and cancer. *Immunology*. 184: 4388-4395.

Laurent J., E.F. Hull, C. Touvrey, F. Kuonnen, Q. Lan, G. Lorusso. 2011. Proangiogenic factor pigf programs cd11b+ myelomonocytes in breast cancer during defferentiation of their hematopoetik progenitors. *Cancer*. 71: 3781-3791.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

Li, N., X. Chen, J. Liao, G. Yang, S. Wang, Y. Josephson, C. Han, J. Chen, M.T. Huang & C. S. Yang. 2002. Inhibition of 7,12-dimethylbenz[α]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamsters by tea and curcumin. *Carcinogenesis*. 23(8). 1307-1313.

Lin, W.W. & M. Karin. 2007. A cytokine-mediated link between innate immunity inflammation and cancer. *Clinical Investigation* 1117: 1175-1183

Liu, J., Y. Duan, X. Cheng, X. Chen, W. Xie, H. Long, Z. Lin, B. Zhu. 2011. IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating vegf production of cancer cells in colorecctal carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 407(2): 348-354.

Lu, K.H., H.W. Yang, C.W. Su, K.H. Lue, S.F. Yang & Y.S. Hsieh. 2013. *Phyllanthus urinaria* suppresses human osteosarcoma cell invasion and migration by transcriptionally inhibiting u-pa via erk and akt signalling pathways. *Food and Chemical Toxixology*. 52: 193-199.

Mahdi, E. S., A. M. Noor, M. H. Sakeena, G. Z. Abdullah, M. F. Abdulkarim, M. A. Sattar. 2011. Formulation and in vitro release evaluation of newly synthesized palm kernel oil esters-based nanomulsion delivery system for 30% ethanolic dried extract derived from local *Phyllanthus urinaria* for skin antiaging. *International Journal of Nanomedicine*. 6: 2499-2512.

Mangan, Y. 2009. **Solusi sehat mencegah dan mengatasi kanker**. Agro Media Pustaka. Jakarta.

Martin, V.T, Behbehani M. 2006. Ovarian hormones and migraine headache: understanding mechanisms and pathogenesis part I & part II. *Journal of Headache*. Vol 46:3-23 & 365-386.

Mau, J.L., E.Y.C. Lai, N.P. Wang, C.C. Chen, C.H. Chang & C.C. Chau. 2003. Composition and antioxidant activity of the essensial oil from *Curcuma zedoaria*. *Food Chemistry*. 82(4): 583-591.

Miossec, P., T. Korn & V.K. Kuchroo. 2009. Interleukin-17 and type 17 helper t cell. *Medicine*. 361(9): 888-898.

Mohan, H. 2010. **TextBook of Pathology: Sixth Edition**. Jaypee Brothers Medical Publisher. New Delhi.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

Noack, M. & P. Miossec. 2014. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmunity Review* 12: 668-677.

Page, T. J., S. O'Brien, C. R. Jefcoate & C. J. Czuprynski. 2002. 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene induces apoptosis in murine pre-B cells through a caspase-8-dependent pathway. *Mol Pharmacol*. 62(2): 313-319.

Theerakulpisut, P., N. Kanawapee, D. Maensiri, S. Bunnag & P. Chantaranothai. 2008. Development of species-specific scar markers for identification of three medical species of Phyllanthus. *Journal of Systematics and Evolution*. 46 (4): 614-621.

Udaya, K. L., T.T. Moore, H.G. Joo, Y. Tanaka, V. Herrmann, G. Doherty, J.A. Drebin, S.M. Strasberg, T.J. Eberlein, P.S. Goedegebuure & D.C Linehan. 2002. Prevalence of regulatory t cell is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *Immunology*. 169. 2756-2761.

Vasiliadou, F. & I. Holen. 2013. The role of macrophages in bone metastasis. *Bone Oncology* 2: 158-166.

Weinberg, R.A. 2007. **The Biology of Cancer**. *Garland Science*. New York.

Welte, T. & X. H. F. Zhang. 2015. Interleukin-17 could promote breast cancer progression at several stages of the disease. *Mediators of Inflamation*. 10. 149-155.

Wilson, B., G. Abraham, V.S. Manju, M. Mathew, B. Vimala, S. Sundaresan & B. Nambisan. 2005. Antimicrobial activity of *Curcuma zedoaria* dan *Curcuma malabarica tubers*. *Ethnopharmacology*. 99(1): 147-151.

Wu, S.J., S.P. Chang, D.L. Lin, S.S. Wang. F.F. Hou & L.T. Ng. 2009. Seupercritical carbon dioxide extract of *Physalis peruviana* induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer H661 cells. *Food and Chemical Toxicology*. 47: 1132-1138.

Zhu, X. W., L. A. Mulcahy, R. A. A. Mohammed, A. H. S. Lee, H. A. Franks, L. Kilpatrick, A. Yilmazer, E. C. Paish, I. O. Ellis, P. M. Patel & A. M. Jackson. 2008. IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research*. 10(6): 7-11).

repository.ub.ac.id

UNIVERSITAS BRAWIJAYA