

**PENGARUH CHERAL TERHADAP PROFIL SEL T
REGULATOR, TGF- β DAN SEL B PADA MENCIT
(*Mus musculus*) MODEL KANKER PAYUDARA**

SKRIPSI

oleh
DEVITA RATNASARI
145090107111012



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

**PENGARUH CHERAL TERHADAP PROFIL SEL T
REGULATOR, TGF- β DAN SEL B PADA MENCIT
(*Mus musculus*) MODEL KANKER PAYUDARA**

SKRIPSI

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

oleh
DEVITA RATNASARI
145090107111012



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

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH CHERAL TERHADAP PROFIL SEL T
REGULATOR, TGF- β DAN SEL B PADA MENCIT
(*Mus musculus*) MODEL KANKER PAYUDARA**

**DEVITA RATNASARI
145090107111012**

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 5 Juli 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelas
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi



Menyetujui
Pembimbing

Drs. Aris Soewondo, M.Si
NIP. 196411221990021001

Mengetahui,
Ketua Program Studi S1 Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Rodiyati Azrianingsih, S.Si., M.Sc., Ph.D
NIP. 197001281994122001



HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Devita Ratnasari
NIM : 145090107111012
Jurusan : Biologi
Judul Skripsi : Pengaruh Cheral Terhadap Profil Sel T Regulator,
TGF- β dan Sel B 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, 19 Juli 2018
Yang menyatakan

Devita Ratnasari
14590107111012

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.



KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Robbil `Aalamiin, dengan ungkapan rasa syukur pada Allah Yang Maha Kuasa akhirnya penulis dapat menyelesaikan peyusunan skripsi yang merupakan 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 Prof. Muhaimin Rifa'i, PhD.Med.Sc selaku pemberi bantuan biaya melalui proyek penelitian sekaligus dosen penguji yang telah memberi pengarah serta saran yang berguna bagi penulis.
3. Bapak Sofi Permana, PhD. Selaku dosen penguji yang telah memberikan saran yang bermanfaat demi perbaikan penyusunan skripsi.
4. Orang tua dan keluarga atas segala do`a, dukungan dan motivasi yang tidak terkira.
5. Dhaniar C., A.M. Larasati S.M., Feri Eko H., dan rekan-rekan Biologi Angkatan 2014 "AMINO 2014" dan seluurh civitas akademik Jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

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

Malang, 19 Juli 2018

Penulis

Pengaruh Cheral terhadap Profil Sel T Regulator, TGF- β dan Sel B pada Mencit (*Mus musculus*) Model Kanker Payudara

Devita Ratnasari, Aris Soewondo

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya
2018

ABSTRAK

Kanker payudara adalah penyakit yang menyebabkan pembelahan sel yang abnormal pada sel-sel penyusun jaringan payudara. Pengobatan kanker payudara umumnya dilakukan dengan kemoterapi seperti pemberian senyawa Cisplatin yang memiliki banyak efek samping. Bahan alami seperti Temu Putih (*Curcuma zedoaria*) dan Meniran (*Phyllanthus niruri*) memiliki efek antioksidan dan immunoregulator. Kedua tumbuhan digabungkan dalam bentuk ramuan Cheral sehingga diharapkan dapat sebagai obat alternatif kanker payudara. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pengaruh pemberian Cheral terhadap sel T regulator, TGF- β dan sel B pada mencit model kanker payudara. Rancangan penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dibagi dalam 6 kelompok perlakuan. Injeksi DMBA dilakukan sebanyak 6 kali dengan dosis 0,015 mg/kg BB mencit secara subkutan pada daerah areola mencit. Injeksi Cisplatin dilakukan dengan dosis sebesar 3 mg/kg BB secara injeksi intraperitoneal. Pemberian Cheral dilakukan selama 14 hari, terdiri atas 3 dosis yakni 1,233 mg/kg BB mencit, 2,466 mg/kg BB mencit dan 4,932 mg/kg BB mencit. Konfirmasi kanker payudara pada mencit dilakukan dengan pembuatan preparat histologi. Analisis statistik dilakukan dengan analisis ANOVA satu arah dan uji lanjutan Tukey HSD dengan selang kepercayaan 95 % menggunakan SPSS versi 20 untuk Windows. Mencit Model kanker payudara menunjukkan jumlah relatif sel T regulator, Sel T regulator yang mengekspresikan TGF- β dan sel B yang tinggi jika dibandingkan dengan mencit sehat. Kondisi kanker payudara menyebabkan meningkatnya ROS akibat kondisi stres oksidatif. Hal ini menunjukkan bahwa ramuan Cheral mampu berperan sebagai obat alternatif untuk pengobatan kanker payudara.

Kata kunci: Cheral, kanker payudara, sel Treg, sel B, TGF- β

repository.ub.ac.id

The Effect Of Cheral Toward The Profil of Regulatory T Cell, TGF- β and B Cell in Mice (*Mus musculus*) Model Of Breast Cancer

Devita Ratnasari, Aris Soewondo

Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences,
Universitas Brawijaya

2018

ABSTRACT

Breast cancer is a disease that causes abnormal cell division in the breast tissue. Treatment of breast cancer using chemotherapy such as the administration of cisplatin compounds have many side effects. Natural ingredients such as Temu Putih (*Curcuma zedoaria*) and Meniran (*Phyllanthus niruri*) have antioxidant effects and immunoregulator. Both of them are combined to formed Cheral potion that can be an alternative medicine for breast cancer. The purpose of this research are to determine the effect of Cheral administration on regulatory T cells, TGF- β and B cells in mice model of breast cancer. In vivo experiment consist of six gropus using breast cancer mice induced by DMBA. DMBA injection was performed 6 times with a dose of 0,015 mg / kg BB in subcutaneous in the areola area of mice. Cisplatin injection was performed with dose of 3 mg / kg BW by intraperitoneal injection. Cheral administration with doses dependent through oral for 14 days. Confirmation of breast cancer in mice was done by making histological preparations from mamae mice. Immunocompetent cells are isolated from the spleen organ then, analyze with flow cytometry. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA analysis and Post Hoc Tukey HSD test with confidence interval 95 % using SPSS version 20 for Windows. Result showed that Mice model of breast cancer have high relative number of regulatory T cells, regulatory T cells that express TGF- β and B cells when compared with healthy mice. Breast cancer conditions because increased ROS due to oxidative stress conditions. Administration of Cheral containing Flavonoids and polyphenols show capability of free radical scavenging. This suggests that Cheral have potential as an alternative medicine for breast cancer treatment.

Keywords: Cheral, breast cancer, Treg cells, B cells, TGF- β

DAFTAR ISI

ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Ramuan Cheral.....	5
2.1.1 Temu Putih (<i>Curcuma zedoaria</i>).....	5
2.1.2 Meniran (<i>Phyllanthus niruri</i>).....	6
2.2 Kanker Payudara	7
2.3 Respon Sistem Imun Terhadap Sel Kanker.....	10
2.4 Sel T Regulator.....	12
2.5 <i>Transforming Growth Factor-β</i>	15
2.6 Sel B.....	16
2.7 Cisplatin	17
BAB III METODE PENELITIAN	20
3.1 Waktu dan Tempat.....	20
3.2 Deskripsi hewan coba.....	20
3.3 Mencit model kanker payudara.....	21
3.4 Pelakuan pemberian Cheral.....	21
3.5 Isolasi sel limfosit dari organ limpa	22
3.6 Pewarnaan antibodi.....	22
3.7 Analisis data.....	23
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	24
4.1 Induksi Kanker Payudara dengan DMBA.....	24
4.2 Pengaruh Ramuan Cheral terhadap Jumlah Relatif sel T CD4 ⁺ CD25 ⁺	26



4.3 Pengaruh Ramuan Cheral terhadap Jumlah Relatif sel T
 CD4⁺CD25⁺ yang mengekspresikan TGF-β..... 29

4.4 Pengaruh Ramuan Cheral terhadap Jumlah Relatif
 sel B..... 32

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN 36

5.1 Kesimpulan 36

5.2 Saran..... 36

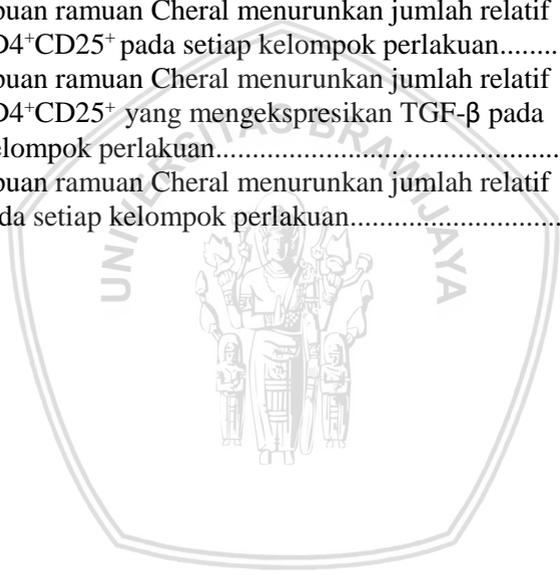
DAFTAR PUSTAKA 37

LAMPIRAN 49



DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1	Perkembangan kanker payudara..... 9
2	<i>Cancer immunoediting</i> 12
3	Mekanisme supresi oleh sel T regulator..... 14
4	Struktur kimia dari Cisplatin..... 18
5	Struktur histologi kelenjar payudara normal perbesaran 100x..... 24
6	Struktur histologi kanker payudara akibat injeksi DMBA pada perbesaran 400 x..... 25
7	Kemampuan ramuan Cheral menurunkan jumlah relatif Sel T CD4 ⁺ CD25 ⁺ pada setiap kelompok perlakuan..... 28
8	Kemampuan ramuan Cheral menurunkan jumlah relatif Sel T CD4 ⁺ CD25 ⁺ yang mengekspresikan TGF- β pada setiap kelompok perlakuan..... 31
9	Kemampuan ramuan Cheral menurunkan jumlah relatif Sel B pada setiap kelompok perlakuan..... 34



DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	Surat pernyataan Laik Etik	49
2	Hasil uji ANOVA untuk jumlah relatif Sel T CD4 ⁺ CD25 ⁺	50
3	Hasil uji ANOVA untuk jumlah relatif Sel T regulator yang mengekspresikan TGF- β (CD4 ⁺ CD25 ⁺ TGF- β ⁺).....	50
4	Hasil uji Tukey HSD untuk jumlah relatif Sel B220 ⁺	50
5	Hasil uji Tukey HSD untuk jumlah relatif Sel T CD4 ⁺ CD25 ⁺	51
6	Hasil uji Tukey HSD untuk jumlah relatif Sel T regulator yang mengekspresikan TGF- β (CD4 ⁺ CD25 ⁺ TGF- β ⁺).....	51
7	Hasil uji Tukey HSD untuk jumlah relatif Sel B220 ⁺	52



DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
BRC	<i>Breast Cancer Susceptibility Gene</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4</i>
CD	<i>Cluster of differential</i>
Cisplatin	<i>Cis-diamminedichloroplatinum (II)</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase</i>
DC	<i>Dendritik cells</i>
DCIS	<i>Ductal carcinoma in situ</i>
DMBA	<i>7,12-Dimethylbenz[α]Anthracene</i>
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony factor</i>
HSD	<i>Honestly significant difference</i>
IDO	<i>Indoleamin-2,3-dyoxxygenase</i>
IFN	<i>Interferon</i>
Ig	<i>Immunoglobulin</i>
IL	<i>Interleukin</i>
LCIS	<i>Lobilar carcinoma in situ</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
MHC	<i>Major histocompability complex</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa- light chain enhancer of activated B cells</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PBS	<i>Phosphat buffer saline</i>
ROS	<i>Reactive oxigen species</i>
TAM	<i>Tumor associated macrophage</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
Treg	<i>T regulator</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

<u>Simbol/ singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
C	celcius
Cm	centimeter
Kg	kiligram



rpm
 α
 β
 μ l

rotation per minute
alfa
beta
mikroliter



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker adalah penyakit yang menyebabkan perubahan pertumbuhan sel menjadi abnormal. Hasil survei menunjukkan sebanyak lebih dari 8,8 juta kematian di dunia disebabkan oleh kanker (Fan dkk., 2006; WHO, 2017). Salah satu jenis kanker yang umum ditemukan adalah kanker payudara. Kanker payudara berada pada urutan kedua pada kematian karena kanker. Kanker payudara memiliki prevalensi 22 % dari seluruh kasus kanker pada wanita. (Fan dkk., 2006; Ferlay dkk, 2012; Ghoncheh dkk., 2016). Indonesia termasuk negara yang memiliki penderita kanker yang cukup tinggi yakni sekitar 347.792 orang atau 1,4 % dari seluruh penduduk Indonesia pada tahun 2013. Kanker payudara memiliki prevalensi tinggi di Indonesia yakni sebesar 0,5 % (Kementerian Kesehatan RI, 2013).

Pertumbuhan kanker adalah suatu proses aktif yang mampu meregulasi adanya respon dari sistem imun. Sistem imun diketahui memiliki kemampuan mengenali dan menghancurkan sel kanker. (Olkhanud dkk., 2009). Sistem imun akan mengenali kanker sebagai suatu antigen. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa sistem imun memiliki peran penting dalam menghambat pertumbuhan dan perkembangan kanker (Abbas dkk., 2015). Limpa sebagai organ limfoid sekunder berfungsi sebagai tempat penyimpanan dari sel-sel limfosit, menghancurkan sel darah merah yang telah kehilangan fungsi dan mengumpulkan antigen dari darah. Limpa memiliki kemampuan untuk meregulasi sistem imun baik secara lokal maupun keseluruhan, sehingga mampu untuk memobilisasi monosit dan limfosit ke organ lain (Rifa'i, 2012; Petroianu, 2011; Bronte & Pittet, 2013). Sel-sel limfosit pada limpa yang teraktivasi dapat mobilisasi menuju lokasi target seperti jaringan kanker. Respon sistem imun terhadap sel kanker salah satunya adalah dengan aktivasi sel T sitotoksik. Sel kanker melakukan perlawanan terhadap sistem imun dengan berbagai mekanisme penghambatan, salah satunya adalah supresi sistem imun oleh sel T regulator ($CD4^+CD25^+$). Sel T regulator adalah sel yang berperan sebagai kontrol proliferasi sel T dan kontrol toleransi perifer. Sel T regulator diyakini memiliki peran penting dalam penyebaran sel kanker karena peningkatan aktivasi dari sel T regulator mengindikasikan prognosis yang buruk (Sakaguchi dkk., 1995; Ohara dkk., 2009). Aktifasi dari sel Treg menyebabkan supresi

sistem imun *innate* dan adaptif. Mekanisme supresi dilakukan dengan menghasilkan sitokin seperti IL-10 dan TGF- β . Sekresi sitokin TGF- β menyebabkan terhambatnya aktifitas sel T sitotoksik, mendukung pembentukan sel Treg dan mempengaruhi komposisi populasi sel B. Sel B berfungsi menghasilkan antibodi dan diduga berperan dalam *tumor-promotor* dengan membantu dalam polarisasi *Tumor associated macrophage* (TAM) (DeNardo dkk., 2007; Olkhanud dkk., 2011; Burkholder dkk., 2014; Biragyn & Longo, 2012). Kanker payudara memiliki mekanisme penekanan respon anti-tumor salah satunya dengan memanfaatkan sifat supresi sel imun. Beberapa jenis sel imun memiliki kecenderungan untuk menekan respon anti tumor seperti makrofag tipe 2 (M2), sel Treg, sel B aktif dan sel neutrofil tipe 2 (N2) (Dupre dkk., 2007; Burkholder dkk., 2014).

Pengobatan dengan kemoterapi telah banyak dilakukan untuk menyembuhkan berbagai jenis kanker termasuk kanker payudara. Obat kemoterapi yang dapat digunakan salah satunya cisplatin (*cis-dichloro diammine platinum(II)*). Efek samping penggunaan cisplatin seperti kerusakan ginjal, saraf dan organ lain. Kerusakan ginjal diakibatkan oleh stres oksidatif dari metabolit radikal cisplatin. Efek samping lain dari penggunaan cisplatin adalah mual dan muntah, hepatotoksisitas, retinopathy, neurotoksisitas dan gangguan pernapasan (Tsang dkk., 2009; Miller dkk., 2010). Obat herbal diperoleh dari tumbuhan mengandung bahan-bahan aktif yang berkhasiat. Obat herbal mengandung senyawa fitokimia yang diduga memiliki sifat antioksidan dan anti-kanker. Penggunaan obat herbal mempunyai efek samping yang lebih rendah jika dibandingkan dengan obat sintesis (Aggarwal & Shisodia, 2006).

Pengembangan obat herbal menjadi salah satu alternatif pengobatan berbagai penyakit seperti infeksi hingga kanker. Berbagai tanaman herbal kemudian digabungkan dan diracik sehingga memiliki khasiat yang lebih tinggi sebagai obat. Cheral adalah salah satu obat herbal yang dikembangkan dan diracik dari gabungan tumbuhan herba yakni Temu Putih (*Curcuma zedoaria*), dan Meniran (*Phyllanthus niruri*). Kombinasi dari kedua tumbuhan mengandung berbagai macam senyawa sehingga mampu meningkatkan efikasinya sebagai obat alternatif terapi kanker. Kandungan Flavonoid dari kedua jenis tumbuhan tersebut telah banyak dibuktikan memiliki aktivitas anti-kanker dan mengandung senyawa antioksidan. Antioksidan diketahui mampu menghambat *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) dan bersifat imunostimulant. Aktivitas dari ROS menjadi salah satu faktor pendukung perkembangan kanker (Halliwell & Gutteridge, 2000; Sharma dkk., 2009).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri*) memiliki kemampuan anti-inflamasi karena mampu menurunkan produksi sitokin IL-6, TNF- α , dan IL-1 β . Ekstrak Meniran (*P. niruri*) mampu menginduksi apoptosis secara *in vitro* pada kanker paru-paru (Huang dkk., 2003; Zhao dkk., 2008). Senyawa curcuminoid dalam Temu Putih (*Curcuma zedoaria*) secara *in vitro* mampu menghambat aktivitas pertumbuhan dari kanker ovarium (Lai dkk., 2004; Laksmi dkk., 2011).

Penelitian terdahulu telah menunjukkan kemampuan dan potensi dari kedua tanaman secara terpisah. Hingga saat ini masih belum ada penelitian yang mengkaji bagaimana ramuan Cheral dapat mempengaruhi respon sistem imun khususnya terhadap sel T regulator, sel limfosit B dan TGF- β yang diekspresikan oleh sel CD4⁺CD25⁺. Oleh karena itu, penelitian diharapkan membantu pemahaman secara imunologi mengenai pengaruh ramuan Cheral terhadap sistem imunitas pada penderita kanker payudara.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian dengan judul “ Pengaruh Cheral terhadap Jumlah Relatif Terhadap Sel T regulator, TGF- β dan sel B pada Mencit (*Mus musculus*) Model Kanker Payudara yaitu:

1. Apakah pengaruh ramuan Cheral terhadap jumlah relatif sel T regulator (CD4⁺CD25⁺) pada mencit model kanker payudara?
2. Apakah pengaruh ramuan Cheral terhadap produksi TGF- β yang diekspresikan oleh sel T regulator (CD4⁺CD25⁺) pada mencit model kanker payudara?
3. Apakah pengaruh ramuan Cheral terhadap jumlah relatif sel B pada mencit model kanker payudara?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian yang dilakukan ini yakni untuk :

1. Mengetahui pengaruh ramuan Cheral terhadap jumlah relatif sel T regulator (CD4⁺CD25⁺) pada mencit model kanker payudara.
2. Mengetahui pengaruh ramuan Cheral terhadap produksi TGF- β yang diekspresikan oleh sel T regulator (CD4⁺CD25⁺) pada mencit model kanker payudara.
3. Mengetahui pengaruh ramuan Cheral terhadap jumlah relatif sel B pada mencit model kanker payudara.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah dapat menambah data pendukung dan informasi mengenai potensi ramuan Cheral sebagai obat alternatif dalam menyembuhkan penyakit kanker payudara. Manfaat lain adalah memberikan informasi dalam bidang imunologi untuk pengembangan obat bioterapi untuk penyakit kanker payudara. Hal lain adalah memberikan wawasan lebih mengenai manfaat Meniran (*Phyllanthus niruri*) dan Temu Putih (*Curcuma zedoaria*) bagi masyarakat umum sebagai salah satu jenis obat herbal.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ramuan Cheral

Ramuan Cheral adalah salah satu obat herbal yang dikembangkan dari kombinasi beberapa ekstrak tanaman herbal. Cheral terdiri atas kombinasi Temu Putih (*Curcuma zedoaria*) dan Meniran (*Phyllanthus niruri*). Ramuan Cheral telah digunakan sebagai obat tradisional yang digunakan untuk pengobatan penyakit kanker di masyarakat. Kandungan senyawa alami yang diperoleh dari alam diduga memiliki efek samping yang lebih kecil dibandingkan dengan obat kemoterapi. Senyawa yang terkandung dalam obat ini seperti, Flavonoid, tanin, steroid dan fisalin menyebabkan obat ini banyak dipilih sebagai salah satu alternatif pengobatan kanker (Singhal, 2004). Salah satu mekanisme kerja dari obat ini seperti mengaktifasi sel – sel imunokompeten seperti sel B dan sel T. Ramuan Cheral umumnya digunakan dengan dosis 12 g/ 60 kg BB manusia untuk setiap harinya. Ramuan Cheral terdiri atas gabungan dari Temu Putih (*Curcuma zedoaria*) dan Meniran (*Phyllanthus niruri*) antara lain :

2.1.1 Temu Putih (*Curcuma zedoaria*)

Temu Putih (*Curcuma zedoaria*) adalah salah satu anggota dari Famili *Zingiberaceae*. Rimpang dari Temu Putih ini beruas-ruas dan berwarna putih kecoklatan. Tanaman ini merupakan salah satu rempah-rempah yang umumnya ditemukan di daerah tropis. Tanaman temu-temuan ini mempunyai berbagai manfaat yang sangat berguna sebagai bahan obat tradisional. Temu Putih memiliki nama lain yakni *Er-chu* di China, yang memiliki manfaat untuk pengobatan kanker serviks. Masyarakat Jepang memanfaatkan Temu Putih sebagai obat untuk penurunan demam, antiseptik dan penghilang bau. Temu Putih di Indonesia seperti, pada masyarakat Makasar telah memanfaatkan Temu Putih sebagai obat kanker. Hal ini karena tanaman ini dipercaya memiliki senyawa aktif yang mampu membunuh sel kanker (Skornickova dkk., 2008; Hamdi dkk., 2014; Nurhayati, 2010).

Senyawa alami yang terkandung di dalam Temu Putih diantaranya adalah Flavonoid, Monoterpen, Sesquiterpen, *Zesoarone*, *Curdione*, *Epicurminol*, *Curzerene*, *Curcumenol* dan *Curcumin*. Temu Putih memiliki ciri rasa yang pahit, pedas dan bersifat hangat. Temu Putih mempunyai berbagai khasiat yakni sebagai anti-neoplastik (anti-kanker),

mengatasi pembekuan darah, pembesaran limpa, anti-radang, meningkatkan pencernaan dan analgetik. Khasiat Temu Putih lainnya adalah dapat meningkatkan efek kemoterapi dan radioterapi untuk membunuh sel kanker (Syu dkk., 1998; Saikia & Nath, 2003; Wijayakusuma, 2008; Mangan, 2009).

Rimpang dari tanaman ini memiliki senyawa yang sangat penting yakni kurkumoid dan minyak atsiri. Uji aktifitas farmakologi menunjukkan ditemukannya efek antimikroba, antikanker dan insektisida. Senyawa kurkumoid adalah senyawa aktif yang dihasilkan oleh tanaman-tanaman yang berada dalam genus *Curcuma* (Halliwell & Gutteridge, 2000). Senyawa aktif lain yang dapat ditemukan adalah seskuipterpenoid yang mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan kanker. Penelitian pada sel *sarcoma* menunjukkan bahwa seskuipterpenoid yang terdapat pada Temu Putih mampu menghentikan pertumbuhan sel kanker (Kokan & Tsumura, 1988). Minyak atsiri yang terdapat pada rimpang tanaman Temu Putih dapat digunakan sebagai antikanker dan antitumor. Minyak yang dihasilkan dari *C. zedoaria* diketahui memiliki efek antiproliferasi pada sel MCF-7 dan OVCAR-3 (Syu dkk., 1998; Rahman dkk., 2013). Penelitian membuktikan bahwa tanaman Temu Putih mengandung senyawa *curdione* yang memiliki kemampuan untuk menghambat produksi *prostaglandin* dan ekspresi dari *cyclooxygenase-2* yang berperan dalam proses inflamasi dan karsinogenik (Ansari & Ahmad, 1991). Ekstrak *C. zedoaria* juga mampu menghambat pertumbuhan *sarcoma 180* (Tachibana & Kawanishi, 1992; Kim dkk., 2000; Ashkenazi, 2008)

2.1.2 Meniran (*Phyllanthus niruri*)

Meniran (*Phyllanthus niruri*) merupakan tanaman yang berasal dari Asia dan dapat ditemukan di seluruh Asia seperti Indonesia. Meniran dapat tumbuh pada ketinggian 1000 meter di atas permukaan air laut dan dapat tumbuh mencapai 40-100 cm. Tanaman ini memiliki akar tunggang dan sepasang bunga. Bunga jantan Meniran berada di bawah dari ketiak daun dan bunga betina ditemukan tepat di ketiak daun. Meniran memiliki daun berbentuk lonjong dan tersusun majemuk (Kardinan & Fauzi, 2004).

Meniran memiliki berbagai senyawa aktif yang sangat bermanfaat untuk pengobatan antara lain adalah polifenol, alkaloid, Flavonoid, tanin, steroid, saponin dan glikosida yang dapat diperoleh dari seluruh bagian tumbuhan. Meniran memiliki berbagai manfaat salah satunya sebagai antihepatotoksik, antibakteri, antimikroba (Manjrekar dkk., 2008).

Bebagai uji klinis menyatakan bahwa Meniran memiliki manfaat sebagai immunodulator. Meniran mampu untuk menekan produksi IL-10 pada pasien penyakit Tuberculosis (TBC) (Calixto dkk., 1998). Penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa tanaman ini memiliki kemampuan untuk memicu sekresi dari berbagai sitokin antara lain, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6 dan IL-12. Hal lain adalah selama penelitian tidak ditemukan adanya efek toksisitas pada berbagai reaksi percobaan (Tjandrawinata dkk., 2017). Meniran memiliki kemampuan antioksidan yang mampu menangkap radikal bebas. Radikal bebas diketahui sebagai penyebab lebih dari 90% penyakit pada manusia seperti arterosklerosis, serangan jantung dan kanker (Gao dkk., 2003; Sayja dkk., 2003).

Kandungan Fitokimia Meniran yang beranekaragam sehingga memiliki kemampuan anti-hepatotoksik, anti-virus dan anti-mikroba. Kandungan Flavonoid dalam Meniran juga menunjukkan manfaat sebagai antioksidan, anti-leismanial dan anti-inflamasi (Bagalkotkar dkk., 2006). Meniran mengandung Asam Galat yang umumnya ditemukan Genus *Phyllanthus* sehingga, mampu untuk menginduksi apoptosis sel pada sel HCG-2 dan HL-60 (Pinmai dkk., 2008). Manfaat Meniran sebagai antikanker didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Whitley dkk. (2003) yang menyatakan bahwa dengan kombinasi antara ekstrak Meniran dan cisplatin mampu menghambat aktivitas sel kanker secara *in vitro*. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa ekstrak aquades dari Meniran memiliki kemampuan menginduksi *down-regulation* dari Bcl-2 dan apoptosis pada *Lewis lung carcinoma cell*. Penggunaan kombinasi Meniran dan cisplatin dalam jangka waktu lama dan dengan konsentrasi tinggi tidak menunjukkan adanya efek negatif untuk sel sehat (Huang dkk., 2003). Penelitian yang dilakukan Tang dkk. (2013) menunjukkan kemampuan Meniran dalam menginduksi supresi dan NF-Kb, MAPK, PI3K/ Akt pathway sehingga memicu apoptosis dari sel kanker.

2.2 Kanker Payudara

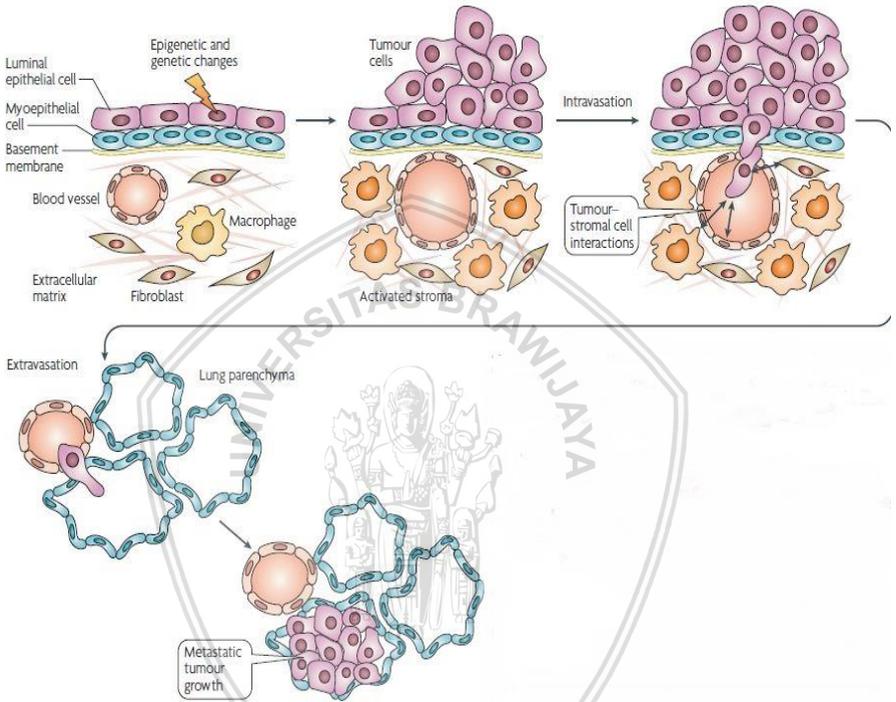
Kanker payudara menjadi salah satu jenis kanker yang umum ditemukan di dunia. Kasus kanker payudara lebih banyak menyerang wanita dibandingkan dengan pria. Kasus kanker payudara paling banyak ditemukan pada kelompok usia perimenopausal (Mohan, 2010). Faktor resiko kanker payudara dipengaruhi oleh jenis kelamin, obesitas, depresi dan pola hidup. Pola hidup individu yang tinggi alkohol, kafein dan lemak meningkatkan resiko dari kanker payudara (Kabel & Fahad, 2015).

Perkembangan kanker payudara melibatkan berbagai peristiwa kompleks seperti disregulasi diferensiasi sel, proliferasi sel yang tidak terkontrol dan resistensi sel terhadap apoptosis. Perkembangan kanker payudara memiliki beberapa tahap yang diawali dengan perubahan sifat pada sel payudara normal. Sel payudara normal pada bagian *terminal ductal lobular unit* terdiri atas lobul dan duktus. Sel normal akan tersusun atas dua lapis sel epitelium yakni *luminal epithelial cell* dan *myoepithelial cell*. Pada duktus *myoepithelial cell* mengelilingi membran basal dan memediasi komunikasi dengan bagian stroma (Hakensen, 2011).

Perubahan pada sel karena perubahan genetik dan epigenetik menyebabkan pertumbuhan sel yang terus menerus. Sel epitelium akan mengalami *epithelial-mesenchymal transition* (EMT) (Gambar 1). Hal ini menyebabkan sel epitelium memiliki kemampuan mesenkimal yang mampu untuk invasi dan migrasi. Sel kanker mampu masuk ke dalam pembuluh darah dan pembuluh limfatik kemudian menyebar. Penyebaran sel kanker keluar dari organ asalnya ini melalui *extravation*. Sel kanker keluar dari pembuluh darah dan masuk pada jaringan baru. Pada jaringan baru, sel kanker akan menghasilkan mikrometastasis dan terus berkembang hingga menghasilkan makroskopik metastasis. Transformasi dari sel epitel payudara dapat terus tubuh hingga terjadinya metastasis. Proses perkembangan sel kanker ini akan menyebabkan menurunnya kontrol terhadap proliferasi, survival, diferensiasi dan migrasi sel (Gogola & Jeffrey, 2007; Scheel dkk., 2007).

Faktor mutasi genetik sangat mempengaruhi perkembangan dari kanker payudara. Beberapa penelitian menunjukkan adanya mutasi pada onkogen, pro-onkogen dan gen *tumor suppressor* menjadi elemen penting perkembangan kanker. Gen PIK 3CA, sebagai gen yang mengkode sub unit yang mengkatalis jalur *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) sekitar 20 - 30 % termutasi pada kanker payudara (Ruder dkk., 2008; Bi'e'che & Rosette, 2011). *Tumor suppressor gene* seperti BRCA1 dan BRCA2 diketahui adanya mutasi pada kasus kanker payudara karena keturunan (Dabbs, 2017). Perkembangan kanker payudara didukung oleh aktivasi jalur MAPKs yang mempengaruhi berbagai program seluler seperti proliferasi sel, diferensiasi sel dan kematian sel (Andreachek & Muller, 2000). Kanker payudara dapat dipengaruhi oleh adanya stres oksidatif. Stres oksidatif dapat terjadi ketika adanya ketidakseimbangan antara oksidan (radikal bebas) dengan antioksidan. Stres oksidatif berperan penting dalam proses inisiasi, promosi dan progresi dari kanker (Jeziarska-Drutel dkk., 2013). *Tumor microenviroment* pada kanker

payudara menghasilkan ROS, sehingga jumlah ROS meningkat. Peningkatan jumlah ROS akan berperan terhadap mutasi pada gen supresi, dan meningkatkan produksi sitokin yang berperan dalam mendukung angiogenesis (Stolarek dkk., 2010).



(Gogola & Jeffrey, 2007)

Gambar 1. Perkembangan kanker payudara

Kanker payudara dapat diklasifikasikan menjadi dua kategori berdasarkan pada penyebarannya yakni karsinoma non-invasif dan karsinoma invasif. Karsinoma non-invasif adalah kondisi saat sel karsinoma belum menyebar ke bagian atau jaringan lainnya. Karsinoma non-invasif berdasarkan letak sel kanker *in situ* dibedakan menjadi *ductal* dan *lobular*. *Ductal carcinoma in situ* (DCIS) adalah proliferasi sel epitelial yang terdapat di dalam struktur epitelial payudara. Jenis kanker ini memiliki sel kanker yang tidak keluar dari basal membran. Pola histologi dari kasus DCIS bervariasi antara lain solid, papillary, komedo

dan lain-lain. Jenis kanker lain adalah *Lobular carcinoma in situ* (LCIS). Karakteristik dari LCIS adalah terjadi distorsi dan distensi pada *terminal duct* dan *acini* di salah satu unit lobular. *Carcinoma invasive* adalah jenis kanker payudara yang telah menyerang jaringan yang berada di sekitarnya. *Carcinoma invasive* memiliki penampakan histologi antara lain sel kanker sudah tidak berada di dalam membran basal. Bagian stroma umumnya menunjukkan adanya respon fibrotik atau desmoplastik. Kanker payudara dapat diklasifikasikan menjadi empat stadium berdasarkan klasifikasi Tumor- Nodus- Metastasis (TNM). Klasifikasi TNM terdiri atas parameter ukuran tumor (T), terdapat atau tidaknya penyebaran hingga ke kelenjar getah bening (N) dan metastasis (M). Stadium I memiliki karakteristik yakni ukuran tumor kurang dari 2 cm dan tidak ada penyebaran ke kelenjar getah bening dan metastasis. Stadium II memiliki ciri yakni ukuran tumor lebih dari 2 cm, kemungkinan telah ada penyebaran ke kelenjar getah bening dan tidak ada metastasis. Stadium III mempunyai ukuran tumor lebih dari 5 cm, telah ada penyebaran ke kelenjar getah bening dan tidak ada metastasis. Stadium IV ditandai dengan ukuran tumor yang sangat besar, terdapat penyebaran ke kelenjar getah bening dan metastasis. Evaluasi terjadinya kanker payudara dapat dilakukan dengan mammograf, *whole breast ultrasound* dan lain-lain. Evaluasi ini dilakukan untuk mengetahui tingkat kemungkinan seseorang untuk terkena kanker payudara. Pengobatan kanker payudara dilaksanakan antara lain dengan biopsi, dan Kemoterapi (Anderson, 2000; Adamowska & Sean, 2005; Stendahl dkk., 2004; Jacobs & Chistina, 2011).

2.3 Respon Sistem Imun terhadap Sel Kanker

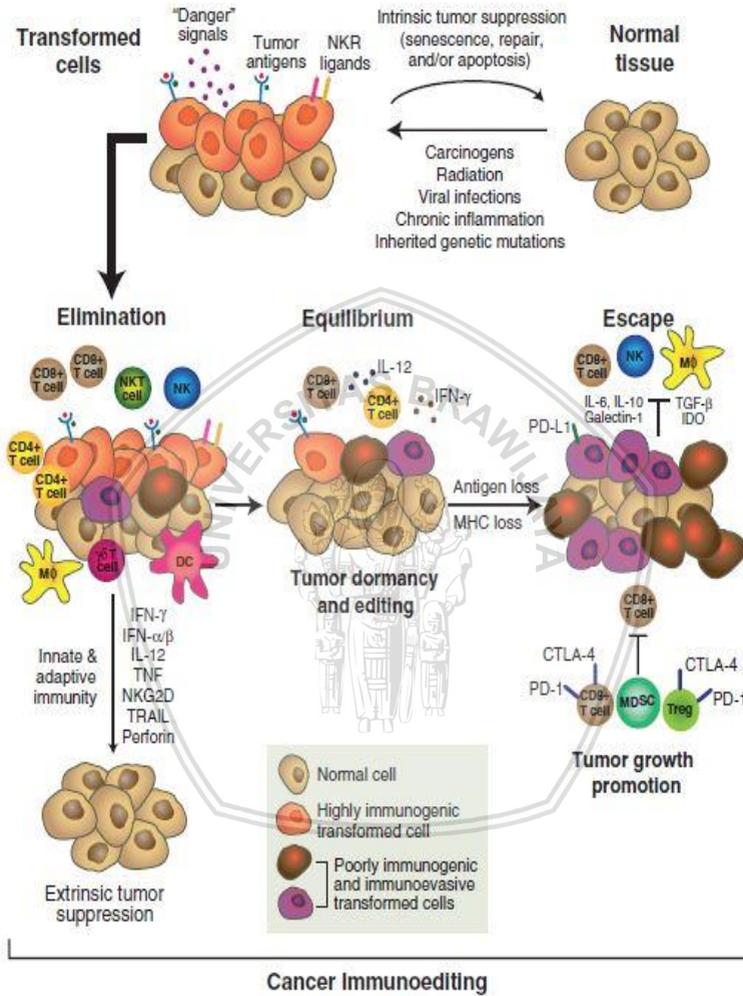
Sistem imun adalah keseluruhan kemampuan khusus tubuh untuk bertahan dan menyerang zat asing yang masuk dalam tubuh. Respon sistem imun yang diberikan tubuh dibagi menjadi dua kategori yakni sistem imun innate dan sistem imun adaptif. Sistem imun innate memiliki waktu respon yang sangat cepat, mampu mengenali sekitar 1000 reseptor dan aktivasinya dipicu oleh kerusakan jaringan, dan mikroba pada protein. Sistem imun adaptif memiliki waktu respon yang lambat dan dapat mengenali jutaan reseptor berbeda. Sistem imun adaptif dipicu oleh patogen, racun, dan kematian sel (Starr & Bavelly, 2007). Respon sistem imun berhubungan erat dengan tiga jenis sel yakni sel limfosit B, sel limfosit T dan APCs. Sel limfosit berada pada *red bone marrow* berasal dari *hematopoietic stem cells*. Sel limfosit T akan bermigrasi melalui

darah menuju *thymus* hingga matang. Sel B akan mengalami pematangan di *bone marrow*. Proses pematangan ini diikuti dengan perkembangan *immunocompetence* dan *self-tolerance* dari sel limfosit. Sel limfosit akan meninggalkan *thymus* dan *bone marrow* menuju organ limfoid sekunder seperti limpa. Sel limfosit akan aktif saat terjadi ikatan dengan antigen, kemudian melakukan proliferasi dan diferensiasi menjadi sel efektor dan sel memori. Sel memori dan sel efektor akan melakukan sirkulasi berkelanjutan melalui organ limfoid sekunder (Marieb & Katja, 2013).

Sistem imun mampu menghambat dan mendukung pertumbuhan kanker dengan proses yang dimanakan *cancer immunoediting*. Proses ini terbagi menjadi tiga tahapan yakni *elimination*, *equilibrium* dan *escape* (Gambar 2). Tahap eliminasi dilakukan dengan deteksi keberadaan sel abnormal dalam tubuh dan menghancurkannya oleh sistem imun innate dan adaptif. Sel-sel kanker memiliki kemungkinan untuk bertahan menghadapi sistem imun. Sel kemudian memasuki masa dorman dimana, terjadi keseimbangan antara sel imunokompeten dengan sel immunosupresi. Tahap ekuilibrium ini sel kanker akan mengalami proses penyuntingan (*editing*) sehingga ketika sel T limfosit mengeliminasi sel kanker menyebabkan tidak semua sel kanker akan terbunuh. Eliminasi hanya membunuh beberapa varian sel kanker karena sel kanker yang telah termutasi muncul kembali. Sel kanker ini memiliki sifat non-immunogenik yang menyebabkan penghambatan terhadap pengenalan antigen oleh sel-sel imunokompeten. Tahapan selanjutnya adalah *escape*. Tahap *escape* ditandai dengan tidak adanya mekanisme penghambatan dari sistem imun. Sel kanker memiliki kemampuan sehingga dapat menghindari sistem imun yang dilakukan dengan menurunkan ekspresi dari antigen tumor, MHC I dan meningkatkan molekul resistensi seperti STAT3. Sel kanker juga akan menghambat apoptosis dengan meningkatkan ekspresi dari molekul anti-apoptosis. Hal ini menyebabkan sel kanker dapat terus tumbuh dan berproliferasi hingga metastasis. (Schreiber dkk., 2011; Wu dkk., 2013; Mendes dkk., 2016).

Sel kanker akan memicu aktivasi dari *immunosupresor cascade* dengan melakukan *intraselular signaling*. *Imunosupresif cascade* ini terdiri dari berbagai molekul immunosupresif seperti TGF- β , IL-10, IL-16, VEGF, PD-L1, COX2 dan IDO/TDO serta sel immunosupresi seperti Treg, dan *myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs). Hal ini menyebabkan sel kanker memiliki *immunosuppressive microenvironment tumor* yang mendukung kehidupan tumor. Penelitian-penelitian dilakukan untuk membalik kerja immunosupresif. Salah satu caranya adalah dengan

melakukan penghambatan pada *intracellular signaling* seperti *MAPK signaling*, *STAT3 signaling* dan *wnt signaling* (Kawaki dkk., 2013).



(Schreiber dkk., 2011)

Gambar 2. Cancer immunoediting

Tumor microenvironment umumnya memiliki jumlah sitokin tinggi. Hal ini seperti TGF- β , IL-10 dan IL-17 yang menunjukkan peran sebagai immunosupresan dan asosiasi Th1 dengan IFN- γ menstimulasi adanya

tumor-specific immunity. Jumlah sel T regulator (Treg) yang tinggi dalam *tumor microenvironment* mengakibatkan penurunan respon imun terhadap tumor. Sel Treg bersama dengan *Myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) berperan menghambat kerja sistem imun (Mendes dkk., 2016).

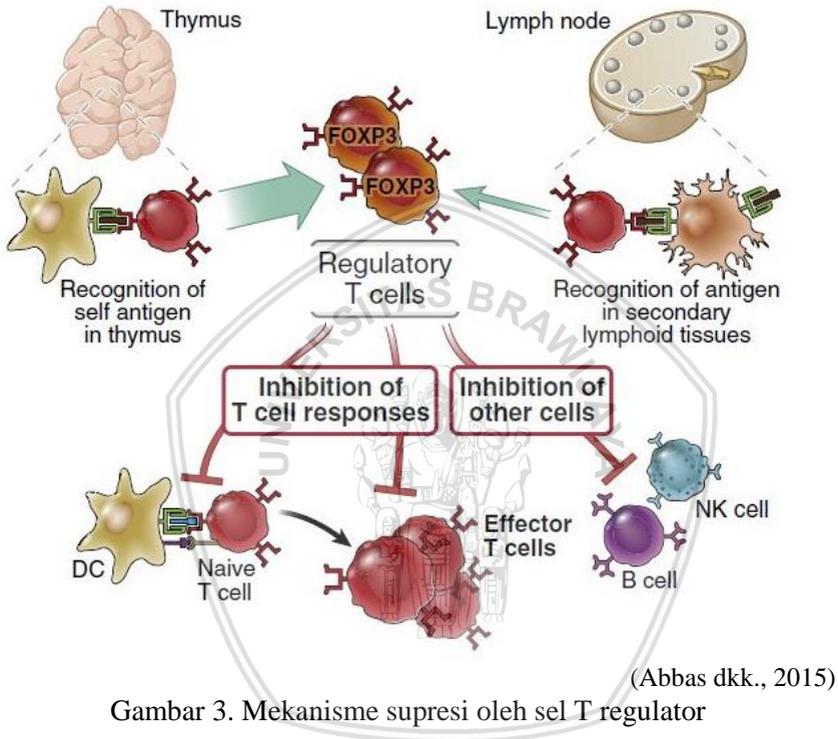
2.4 Sel T Regulator

Sel T regulator (Treg) adalah salah satu dari subset sel T yang memiliki peran untuk menjaga homeostatis dan *self-tolerance* dari sistem imun. Sel Treg juga berperan dalam mengatur sistem imun saat terjadi autoimun, infeksi, inflamasi dan tumor (Sakaguchi dkk., 2008). Perkembangan dari sel T diawali pada timus dan diatur oleh gen TCR. *Positive selection* akan mempertahankan sel dari apoptosis dan memberi kemampuan untuk bereaksi terhadap molekul MHC. Sel Treg mengontrol respon imun secara luas. Sel memiliki kemampuan untuk beradaptasi pada berbagai kondisi dalam tubuh (Coombes dkk., 2007). Populasi sel T regulator terdiri atas populasi sel T CD4 yang mampu mengekspresikan CD25 dan memiliki kemampuan untuk mengendalikan sel imun lain. Sel T regulator ($CD4^+CD25^+$) terdiri atas 4-10% dari keseluruhan populasi sel T CD4. Hilangnya sel T regulator dari dalam tubuh dapat mengakibatkan terjadinya autoimun dan proliferasi sel yang tidak terhenti. Hal ini dapat diketahui dari penelitian yang menunjukkan bahwa perlakuan *Tymectomy* pada mencit sebelum umur 3 hari akan mengakibatkan mencit tersebut menderita autoimun. *Tymectomy* yang dilakukan pada mencit setelah usia 3 hari tidak menunjukkan adanya autoimun (Sakaguchi, 2009).

Sel T regulator memiliki beberapa penanda (*marker*) yang terdapat baik pada permukaan sel atau intra sel. Penanda tersebut antara lain ekspresi positif dari molekul CD25, CTLA-4, GITR OX40 dan L-selektin (CD62L). Molekul yang berperan sebagai penanda penting dari sel T regulator adalah ekspresi dari Foxp3. Hal ini karena Foxp3 adalah protein spesifik yang hanya terdapat pada sel T regulator dan dibutuhkan dalam proses transkripsi, sehingga mampu mengidentifikasi sel T $CD4^+CD25^+$. Penanda CD25 dan GITR adalah penanda dari sel T regulator yang bersifat tidak mutlak karena masih mampu untuk di ekspresikan pada sel-sel lain yang teraktivasi (Viglietta dkk., 2004).

Sel regulator diregulasi oleh ekspresi dari faktor transkripsi Foxp3. Sel T ini berperan sebagai “regulator utama” dari subset-subset sel T. Sel Treg akan mengaktifkan kemampuan supresor yang dimilikinya melalui beberapa mekanisme yakni *contact dependent* dan *independent*

mechanism (Gambar 3). Sel T regulator mampu secara langsung dengan melakukan mekanisme supresor melalui kontak antar sel tanpa ada intervensi dari *Antigen Presenting Cell* (APC). Mekanisme supresi lain yang dilakukan oleh sel T regulator adalah dengan menekan sintesis dari IL-2 (Schemidt dkk., 2012; Rifa'i, 2016).



Gambar 3. Mekanisme supresi oleh sel T regulator

Mekanisme supresi oleh sel Treg dapat menyebabkan apoptosis sel T efektor. Hal ini karena adanya interaksi antara CTLA-4 dengan molekul CD80/86 sehingga terjadi pengaktifan IDO (indoleamin-2,3-dioxygenase) pada APC. Aktivasi IDO menyebabkan peningkatan metabolisme triptofan, sehingga persediaan triptofan pada sel T CD4⁺ berkurang. Triptofan mempunyai peran penting dalam aktivasi CD4⁺ dan menjaga survival sel T efektor. Keadaan kekurangan triptofan ini dapat memicu terjadinya apoptosis sel. Aktivasi IDO ini menjadi salah satu mekanisme supresi sel T regulator pada target (Rifa'i, 2012).

Keadaan masuknya patogen penginfeksi akan menyebabkan peningkatan sel-sel efektor. Tahapan awal infeksi, sel Treg tidak akan melakukan fungsinya sebagai supresor. Hal ini untuk memastikan bahwa kerja sel-sel efektor tidak terhambat. Tahap infeksi menyebabkan sel-sel T regulator akan lebih aktif melakukan proliferasi dengan bantuan IL-2 yang diperoleh dari sel-sel efektor yang telah aktif. Sitokin TGF- β memiliki peran penting untuk memicu Treg untuk berdiferensiasi dari CD4 naive dan dalam menjaga homeostatis Treg. Fase akhir infeksi, maka sel Treg dapat menjalankan fungsinya sebagai supresor (Wanjun, 2011; Rifa'i, 2012).

Sel T regulator dapat dibedakan menjadi dua jenis sel berdasarkan mekanisme terbentuknya yakni *natural accuring regulatory T cell* atau *natural accuring regulatory T cell* dan *induced regulatory T cell*. *Natural accuring regulatory T cell* adalah populasi sel T yang perkembangannya terjadi pada organ timus. *Induced regulatory T cell* adalah sel T yang perkembangannya terjadi pada daerah periferal. *Induced regulatory T cell* memiliki kemampuan untuk mencegah inflamasi pada organ tertentu, namun tidak berfungsi untuk menangani inflamasi secara menyeluruh seperti pada penyakit autoimun. *Natural accuring regulatory T cell* memiliki kinerja yang lebih efektif pada penyakit autoimun. Sel Treg memiliki ukuran sel yang lebih kecil jika dibandingkan dengan sel T lain. *Natural accuring regulatory T cell* merupakan populasi sel T yang mengekspresikan CD25 (Lepine, 2004).

Sel T regulator yang diteliti pada kanker payudara menunjukkan bahwa sel Treg memiliki hubungan positif dengan reseptor hormon esterogen. Hal ini menyebabkan sel T regulator dapat digunakan sebagai marker untuk mendeteksi kanker payudara (Gobert dkk., 2009). Menurut Chaudary & Eyad (2016) menyatakan bahwa sel Treg berperan sebagai *anti-tumor immune response* dan perkembangan *immunosuppressive tumor microenvironment*. Populasi sel T regulator memiliki kemampuan untuk mengetahui keadaan *microenvironmental* yang sedang terjadi dalam keadaan *in vivo*. Kemampuan ini menyebabkan invasi imun dan perkembangan kanker.

2.5 Transforming Growth Factor- β (TGF- β)

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) memiliki tiga jenis isoform yang dapat ditemukan pada manusia yakni TGF- β 1, TGF- β 2 dan TGF- β 3. Isoform dari TGF- β ini memiliki kompleks reseptor dan signaling yang sama. Perbedaan antara ketiga isoform ini dapat teramati dari level

ekspresi antar jaringan dan sel yang berbeda. Aktivasi dari TGF- β terjadi melalui pelepasan dari matriks ekstraseluler. TGF- β akan berikatan dengan kompleks reseptor tetramer yang terjadi atas dua reseptor TGF- β tipe I dan dua reseptor TGF- β tipe-II. TGF- β memiliki peran penting sebagai pusat dan penyeimbang dalam sistem imun. Peran dari TGF- β adalah mampu untuk menekan proliferasi dari seluruh prekursor sel imun dan menekan proliferasi sel T dan fungsi efektifnya. Peran lain adalah menghambat *cyclin-dependent kinase* sehingga mampu menginduksi terjadinya *cell arrest*. Kemampuan lain dari TGF- β adalah mampu menginduksi terjadinya apoptosis melalui *Bim pathway* pada sel B. TGF- β ini umumnya diekspresikan oleh seluruh jaringan, tetapi mengalami *overexpression* pada berbagai jenis penyakit seperti kanker. TGF- β dapat diekspresikan oleh beberapa sel seperti sel epitelial, fibroblas, eosinofil, makrofag dan sel T regulator. Regulator utama dari TGF- β adalah adanya faktor transkripsi *fork-head p3* (Foxp3) (Ratcliffe, 2016).

Transforming Growth Factor- β adalah suatu molekul regulatori yang memiliki efek pleiotropik pada sel proliferasi, diferensiasi, migrasi dan lain-lain. *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) termasuk dalam kelompok super Famili TGF dan terdiri atas 3 homolog yakni TGF- β 1, TGF- β 2 dan TGF- β 3. TGF- β 1 adalah isoform yang paling banyak terdapat pada sistem imun. TGF- β disintesis sebagai pro- TGF- β prekursor. Sitokin TGF- β mampu untuk menghambat proliferasi sel T, diferensiasi dan survival. TGF- β akan menghambat proliferasi sel T dengan menghambat produksi IL-2 melalui Smad3. TGF- β juga menyebabkan *down-regulation* dari ekspresi *cyclinD2*, *F*, *CDK4* dan *c-myc*. TGF- β memiliki kemampuan menghambat Th1 dan Th2 melalui ekspresi dari Stat4 dan GATA-3. Mekanisme penghambatan CTL oleh TGF- β terjadi melalui *c-myc*. TGF- β juga akan menyebabkan induksi ekspresi Foxp3. TGF- β memiliki hubungan dengan pertumbuhan kanker. Sel kanker akan menghasilkan TGF- β atau menginduksi produksi dari TGF- β . Hal ini menyebabkan pertumbuhan kanker semakin cepat dan menyebabkan adanya invasi pada sistem imun. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa TGF- β mampu menyebabkan pertumbuhan kanker melalui sel T regulator (Li dkk., 2006).

Sel kanker menggunakan kemampuan immunosupresi dari TGF- β untuk menghindari sistem imun tubuh dan menginduksi pertumbuhan tumor serta metastasis. Sel kanker memiliki kemampuan untuk memodifikasi komponen dari signaling TGF- β seperti mutasi pada T β RII dan jalur Smad4. Hal ini menyebabkan supresi dari respon anti-tumor dan adanya toleransi. TGF- β juga berperan sebagai kemoatraktan untuk

monosit dan makrofag sehingga akan bermigrasi ke daerah tumor. Makrofag yang telah berada di daerah tumor ini akan mampu untuk mengubah kondisi *microenvironment* dari kanker (Park dkk., 2009; Teicher, 2007; Pollard, 2004).

2.6 Sel B

Sel B adalah sel imun yang memproduksi antibodi yang digunakan untuk melawan antigen yang masuk ke dalam tubuh. Sel B berperan dalam meregulasi beberapa diversitas reseptor permukaan sel sehingga mampu untuk mengenali antigen spesifik. Sel B meregulasi dan memediasi beberapa fungsi lain yang penting untuk homeostatis sistem imun. Hal ini dilakukan dengan sekresi sitokin dan mampu mengekspresikan kompleks reseptor spesifik pada permukaan sel-nya. Fungsi dari sel B dalam beberapa penyakit seperti kanker dan autoimun telah banyak dibuktikan. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa sel B berperan dalam perkembangan sel kanker karena adanya sekresi *tumor-promoting function* (Cascalho dkk., 2000; Fremd dkk., 2013).

Sel B220 adalah salah satu protein pertama yang dapat diidentifikasi dan terdapat di permukaan turunan dari sel B pada mencit. Penanda B220 juga dikenal sebagai *marker* CD45R yang umumnya digunakan sebagai penanda dari sel B, dan sebegini kecil dari sel dendritik (*plasmacytoid dendritic cell*). Penamaan B220 diusulkan oleh Coffman dan Wiessan pada tahun 1981 untuk varian 220kDa dari glikoprotein T200. Glikoprotein ini adalah salah satu protein yang banyak ditemukan pada sel-sel limfosit (Allaman & Pillai, 2008).

Sel B220 adalah salah satu isoform dari sel CD45. Sel B220 digunakan sebagai marker untuk sel B dewasa dan sel B non-aktif. Aktivasi dari B220 umumnya diikuti dengan *up-regulation* dari CD19 pada pro-sel B. Ekspresi dari B220 dapat ditemukan pada prekursor sel B, setelah sel B mengalami pengenalan antigen, dan memasuki lokasi sel B memori. Antibodi monoklonal yang mengenali B220 akan mampu mengenali *cell surface antigen* yang diekspresikan dari sel T dan B limfosit manusia. Hal ini menunjukkan bahwa dapat ditemukan ekspresi B220 pada sel B manusia. Sel B220 umumnya diekspresikan pada *mantle zone* pada organ limfoid sekunder. Sel B220 juga dapat diekspresikan oleh subset dari sel limfosit yang terdapat di *germinal centers* (Rodig dkk., 2005).

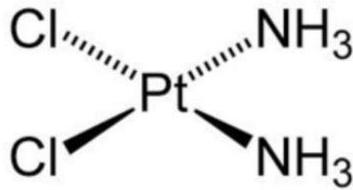
Menurut Abbas dkk. (2015) menyatakan bahwa sel B teraktivasi melalui dua cara yakni *T-dependent* dan *T-independent*. Mekanisme *T-dependent* diawali dengan adanya pengenalan protein antigen oleh sel T

helper. Pengenalan protein antigen berperan penting dalam aktivasi sel B. Polisakarida, lipid dan berbagai non-protein lainnya mampu menyebabkan stimulasi produksi antibodi. Respon ini terjadi tanpa adanya bantuan dan sel T helper sehingga respon ini terjadi secara *T-independent*. Menurut Baratawidjaja & Iris(2013) bahwa aktivasi sel B melalui *T dependent* dilakukan dengan beberapa cara salah satunya adalah sekresi sitokin. Sitokin yang dihasilkan sel T seperti IL-4, IL-6, IL-5, IL-2 dan IFN- γ menyebabkan peningkatan proliferasi sel B dan diferensiasi menjadi sel B plasma yang memproduksi antibodi.

Interaksi antara sel T dan sel B ini akan menghasilkan sinyal melalui koreseptor CD40L-CD40. Hubungan koreseptor CD40L-CD40 atas pengaruh dari IL-4 akan berperan penting dalam imunoregulasi dan pengalihan kelas imunoglobulin (Ig) (Sompayrac, 2003). Menurut Rifa'i (2012) menyatakan bahwa interaksi antara CD40 dan CD40L akan menghasilkan sinyal sedangkan adanya interaksi antara B7-CD28 akan menghasilkan kostimulasi pada sel T helper. Sel B akan mulai mengekspresikan reseptor untuk berbagai sitokin yang dilepaskan oleh sel T helper sehingga terjadi pengikatan sitokin. Hal ini dilakukan dengan tujuan untuk mengirimkan sinyal sehingga dapat membantu progresi dari sel B yang mengakibatkan terjadinya sintesis DNA dan diferensiasi sel.

2.7 Cisplatin

Cisplatin (*cis-diamminedichloroplatinum* (II)) adalah salah satu obat kemoterapi yang banyak digunakan dalam pengobatan berbagai jenis kanker. Senyawa ini dianggap efektif untuk mengatasi berbagai jenis kanker seperti karsinoma, limfoma dan sarkoma. Cisplatin adalah senyawa platinum dengan bentuk segi empat dan berbentuk bubuk dengan warna putih atau kuning (Gambar 4). Cisplatin termasuk sebagai salah satu obat kemoterapi yang paling banyak digunakan. Hal ini karena cisplatin menunjukkan kemampuan anti-kanker pada berbagai jenis kanker seperti ovarium, dan testis. Pengobatan dengan cisplatin menunjukkan berbagai efek samping sehingga pengobatannya umumnya dikombinasikan dengan obat kanker lain (Frezza dkk., 2010).



(Dasari & Paul, 2014)

Gambar 4. Struktur kimia dari cisplatin

Cisplatin berdasarkan penelitian klinis menunjukkan bahwa mampu menyembuhkan 90 % penderita kanker testikular, ovarium dan serviks. Cisplatin pertama kali disintesis pada tahun 1845 dan pada 1960 baru dilaksanakan suatu investigasi. Hasil investigasi ini menunjukkan bahwa platinum dalam elektroda mampu menghambat pembelahan sel dari bakteri *Escherichia coli*. Cisplatin diduga mampu menunjukkan efek anti-kanker karena adanya interaksi dengan DNA sehingga menginduksi apoptosis sel. Cisplatin juga menjadi sasaran dari protein-protein yang ada di plasma darah seperti, serum albumin manusia. Hal ini dapat menyebabkan tidak terjadi aktivasi dari cisplatin (Alderden dkk., 2006).

Mekanisme kerja cisplatin untuk menginduksi apoptosis sel diduga berhubungan dengan interaksi dengan DNA. Cisplatin yang teraktivasi akan masuk ke dalam sel. Setelah di dalam sitoplasma, maka atom klorida digantikan dengan molekul air. Cisplatin akan berikatan dengan N7 di residu purin sehingga mampu menyebabkan kerusakan DNA pada sel kanker, menghambat pembelahan sel dan menyebabkan apoptosis sel. Hal ini didukung dengan penelitian yang membuktikan bahwa terjadinya hipersensitifitas terhadap cisplatin pada sel prokariotik dan eukariotik yang kekurangan *DNA repair* (Dasari & Paul, 2014).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

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

1.2 Deskripsi Hewan Coba

Penelitian dilakukan menggunakan hewan coba Mencit (*Mus musculus*) betina yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT), Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. Mencit yang digunakan berusia 7-8 minggu. Mencit memiliki berat badan berkisar antara 25 – 30 gram. Mencit diaklimatisasi selama 1 minggu sebelum dilakukan perlakuan.

Mencit dirawat pada ruang khusus hewan coba dengan diletakkan pada kandang. Perawatan dan 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. Ruang dijaga untuk memiliki suhu sekitar 37 °C. Kandang mencit dijaga kebersihannya dengan mengganti sekam sebanyak 3 kali dalam seminggu. Mencit diberi makanan dan minuman yang normal setiap hari.

1.3 Rancangan Penelitian

Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Mencit dikelompokkan menjadi 6 perlakuan yang terdiri atas kontrol sehat (K-), kontrol kanker (K+), perlakuan cisplatin (P1) dengan dosis 3 mg/ kg BB mencit, perlakuan dosis Cheral 2,466 mg/kg BB mencit (P2), perlakuan dosis Cheral 1,233 mg/kg BB mencit (P3) dan perlakuan dosis Cheral 4,923 mg/kg BB mencit (P4). Setiap perlakuan terdiri atas 4 ulangan, sehingga total jumlah mencit yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 24 ekor.

1.4 Pembuatan Hewan Model Kanker Payudara dengan Induksi DMBA

Mencit yang telah diaklimatisasi selama 1 minggu, selanjutnya diberi perlakuan DMBA sehingga menjadi mencit model kanker payudara. Mencit yang berusia sekitar 8 minggu diinjeksi dengan 7,12-Dimethylbenz[α]anthracene (DMBA) untuk menginduksi kanker (Jayakumar dkk., 2014). Dosis DMBA (Tokyo Chemical Industry, JPN) yang digunakan sebesar 0,015 mg/kg BB mencit yang dilarutkan dalam minyak jagung. Injeksi DMBA dilakukan secara subkutan pada daerah sekitar Areola. Injeksi dilakukan sebanyak enam kali dengan selang waktu 1 minggu. Massa setiap mencit ditimbang untuk menentukan volume DMBA yang diinjeksi. Pengamatan dengan teknik palpasi dilakukan untuk memeriksa terbentuknya nodul pada mencit. Deteksi terbentuknya kanker payudara pada kelenjar mammae juga dilakukan dengan mengamati jaringan Kelenjar Mammae secara Histologi.

1.5 Perlakuan Pemberian Cheral dan Cisplatin

Mencit (*Mus musculus*) yang telah diinjeksi dengan DMBA selama 6 minggu, kemudian diberi perlakuan Cheral (Makasar). Mencit dibagi menjadi 6 kelompok yang terdiri atas kelompok kontrol sehat, kontrol kanker, kanker dengan cisplatin dan kanker dengan Cheral. Terapi Cheral dilakukan setiap hari selama 2 minggu dengan 3 dosis berbeda secara oral pada setiap kelompok perlakuan. Cheral dilarutkan dengan larutan akuades. Perlakuan cisplatin (Dankos Farma, INA) dilakukan dengan melarutkan dalam larutan PBS kemudian, diinjeksikan secara intraperitoneal. Injeksi cisplatin dilakukan sebanyak 7 kali dalam 14 hari dengan selang waktu setiap dua hari. Dosis cisplatin yang digunakan adalah 3 mg/kg BB mencit (Chen dkk., 2015). Massa tubuh mencit ditimbang untuk menentukan volume Cheral dan cisplatin yang diberikan pada mencit. Kelompok perlakuan terdiri atas kelompok 1 kontrol sehat yakni kelompok mencit sehat yang tidak diberi perlakuan injeksi DMBA dan Cheral (Tabel 1). Kelompok 2 kontrol kanker adalah kelompok mencit yang diinjeksi dengan DMBA dan tidak diberi perlakuan Cheral. Kelompok 3 adalah kelompok mencit yang diinjeksi dengan DMBA dan diberi perlakuan Cisplatin sebanyak 3 mg/kg BB mencit. Kelompok 4 adalah kelompok perlakuan yang diinjeksi dengan DMBA dan diberi Cheral sebanyak 1,233 mg/kg BB mencit. Kelompok 5 yaitu kelompok mencit yang diinjeksi dengan DMBA dan diberi Cheral sebanyak

2,466mg/ kg BB mencit. Kelompok 6 adalah kelompok mencit yang diinjeksi dengan DMBA dan diberi Cheral sebanyak 4,932 mg/ kg BB mencit.

Tabel 1 Pembagian Kelompok Perlakuan

Kelompok perlakuan	Injeksi DMBA	Cheral	Cisplatin
1	-	-	-
2	+	-	-
3	+	-	+
4	+	+	-
5	+	+	-
6	+	+	-

Keterangan : (-) = tidak ada perlakuan dan (+) = ada perlakuan

1.6 Prosedur Analisis dengan *Flow cytometry*

Prosedur analisis dengan teknik *flow cytometry* dilakukan berdasarkan metode Rifa'i dkk. (2017). Mencit dibunuh dengan cara dislokasi leher. Mencit diletakkan terlentang pada papan bedah dan ditahan menggunakan jarum pentul. Bagian ventral mencit dibersihkan menggunakan alkohol 70 %. Mencit dibedah secara vertikal hingga organ bagian dalam organ mencit dapat terlihat. Organ limpa yang terletak di belakang bagian lambung diisolasi. Limpa dicuci dengan PBS sebanyak 2x. Kemudian, organ limpa dihancurkan dengan ditekan menggunakan pangkal spuit searah jarum jam hingga, homogen. Homogenat dari limpa dimasukkan kedalam tabung propilen dan ditambah PBS hingga mencapai volume 6 mL. Homogenat dalam tabung propilen, kemudian disentrifugasi pada 2.500 rpm dengan suhu 10 °C selama 5 menit. Supernatan kemudian dipisahkan dan bagian pelet ditambah dengan 1 ml PBS. Suspensi sel dimasukkan ke dalam mikrotub sebanyak 50 µl dan ditambahkan dengan 500 µl larutan PBS. Langkah selanjutnya, dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 5 menit pada suhu 10° C. Supernatan hasil sentrifugasi dipisahkan, pelet kemudian ditambahkan dengan 50 µl pewarna antibodi ekstraseluler hingga homogen. Antibodi ekstraseluler yang digunakan adalah *flourescein isothiocyanate* (FITC) *anti-mouse* CD4 (BioLegend, USA), FITC-*conjugated anti-mouse* CD25 (BioLegend, USA) dan anti-B220. Sampel kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu 4°C dalam kondisi gelap. Sampel ditambah *cytofix* (BioLegend, USA) sebanyak 50 µl. Kemudian, sampel diinkubasi selama 20 menit pada suhu 4°C dalam kondisi gelap dan dilanjutkan dengan

ditambah *washperm* (BioLegend, USA) sebanyak 500 μl . Sampel selanjutnya disentrifugasi pada 2.500 rpm dengan suhu 10 °C selama 5 menit. Pelet kemudian ditambah antibodi intraseluler yakni anti-TGF- β dan diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 4°C. Sampel kemudian ditambah PBS 400 μl . Sampel selanjutnya dipindahkan ke dalam kuvet Hasil kemudian dianalisis dengan flow sitometer (*BD Biosciences FACSCaliburTM*, USA).

1.7 Analisis Data

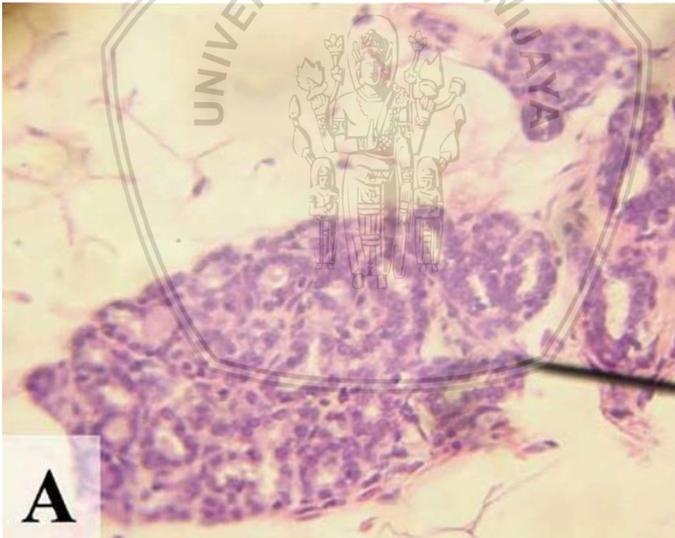
Hasil flow sitometri dianalisis menggunakan program *BD Cell Quest ProTM*. Analisis statistik menggunakan program SPSS versi 20 untuk Windows dan diuji ANOVA satu arah. Uji ANOVA satu arah dilakukan dengan nilai $\alpha = 5\%$ dan dilanjutkan dengan uji lanjutan. Uji lanjutan menggunakan uji *Tukey Honestly Significant Difference (HSD)* untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan antara setiap perlakuan.



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Induksi Kanker Payudara dengan DMBA

Kelenjar payudara berkembang dari sekumpulan sel-sel yang terus berproliferasi yang berasal dari bagian ektoderm. Jumlah kelenjar payudara pada setiap mamalia berbeda-beda, seperti mencit yang memiliki lima pasang dan manusia satu pasang kelenjar payudara. Kelenjar payudara terdiri atas beberapa struktur epitelial seperti *luminal ephytelial of ducts*, duktus, *alveolar buds*, *alveoli* dan *myoephytelial layer*. Kelenjar payudara mencit pada kondisi normal hanya terdiri atas duktus yang berujung pada *Terminal End Bud* (TEB) seperti penampakan pada Gambar 5 (Calaf & Carlos, 2012; Liska dkk., 2016).

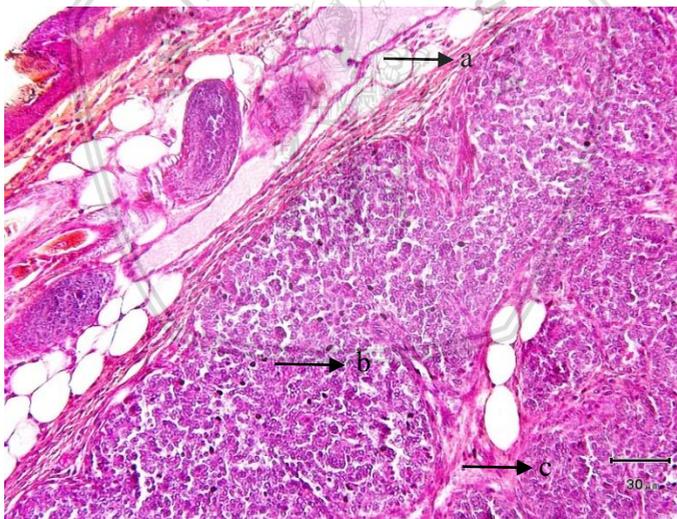


(Calaf & Carlos, 2012)

Gambar 5. Struktur histologi kelenjar payudara normal pada perbesaran 100x

Kondisi hewan coba setelah dilakukan injeksi DMBA secara morfologi menunjukkan adanya benjolan pada daerah injeksi. Benjolan

tersebut mempunyai karakteristik yakni keras, berwarna kehitaman dan adanya kerontokan rambut di sekitar daerah injeksi. Pengamatan morfologi dilanjutkan dengan pembuatan preparat histologi dari kelenjar mammae mencit model kanker payudara. Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa karsinogenik 7,12-Dimethylbenz[α]Anthracene (DMBA) mampu menginduksi kanker payudara. Hal ini dibuktikan berdasarkan pengamatan histologi pada kelenjar mammae mencit sesuai dengan Gambar 6. Senyawa DMBA mampu menginduksi kanker payudara tipe karsinoma invasif. Struktur histologi dari irisan preparat menunjukkan bahwa pada jaringan ikat dapat ditemukan sel-sel karsinoma. Karsinoma invasif ditandai dengan adanya invasi pada stroma karena proliferasi sel karsinoma mampu melewati *ductal*. Sel karsinoma memiliki karakteristik pleomorfik, memiliki berbagai ukuran, memiliki nukleus yang lebih besar dibandingkan sel normal dan terdapat banyak fase mitosis (Rossai, 2011).



Gambar 6. Struktur histologi kanker payudara akibat injeksi DMBA pada perbesaran 400 x. Keterangan: a. sel adiposit; b. sel karsinoma; jaringan ikat.

Berdasarkan pengamatan histologi juga dapat diketahui bahwa ditemukan sedikit sel adiposit dan sel karsinoma nampak memenuhi jaringan. Struktur histologi payudara normal memiliki bagian jaringan epitel yang melekat pada bagian stromal. Bagian epitel terdiri atas epitel basal dan epitel luminal. Epitel basal melapisi bagian lumen duktus yang umumnya terdiri atas sel epitel kuboid. Epitel lumial terdiri atas sel myoepitel yang terletak disekitar lapisan luminal. Bagian stromal umumnya didominasi oleh sel-sel adiposit (Visvader, 2009; Hossiotou & Donna, 2013).

4.2 Pengaruh Ramuan Cheral terhadap Jumlah Relatif Sel T CD4⁺CD25⁺

Populasi sel T CD4⁺ yang mengekspresikan CD25⁺ memiliki kemampuan untuk mengatur respon sistem imun terhadap infeksi, autoimun, inflamasi dan tumor. Sel T regulator dalam keadaan normal berpera untuk menjaga homeostasis dari sistem imun (Sakaguchi dkk., 2008). Hasil penelitian menunjukkan jumlah relatif dari populasi sel T regulator pada mencit model kanker payudara mengalami peningkatan yang signifikan ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan mencit kontrol sehat (Gambar 7). Jumlah relatif sel T CD4⁺ CD25⁺ yang meningkat pada kondisi kanker dapat terjadi sebagai bentuk respons terhadap inflamasi yang terjadi dalam kondisi kanker. Pada kondisi kanker banyaknya antigen tumor yang diekspresikan oleh MHC II pada sel APC. Hal ini menyebabkan meningkatnya aktivasi dari sel T CD4⁺ yang mengekspresikan CD25⁺ untuk meningkatkan proliferasi dari sel-sel imunokompeten. Perkembangan sel kanker yang semakin parah akan memanfaatkan populasi sel T CD4⁺ CD25⁺ yang memiliki sifat immunosupresant. Sel T regulator (CD4⁺CD25⁺) mempunyai kemampuan immunosupressant dengan menekan aktifitas sel T sitotoksik, *Natural Killer*, dan dendritik. Kemampuan ini menyebabkan terus terjdinya invasi imun dan perkembangan kanker payudara (DeNardo dkk., 2007; Wu dkk., 2013).

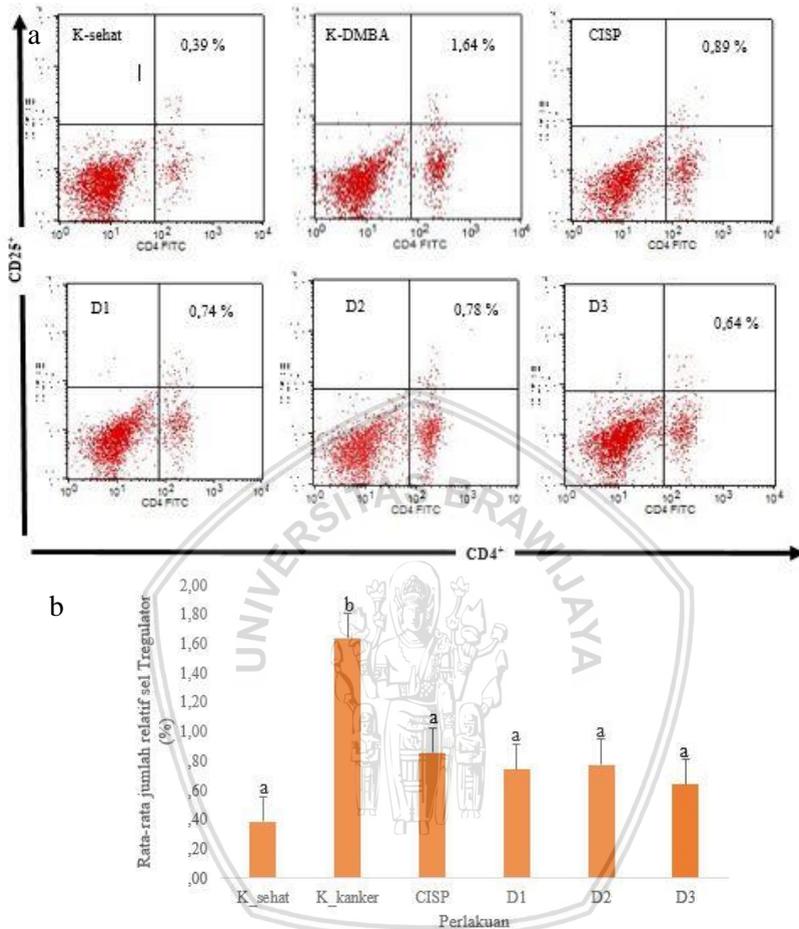
Hasil penelitian ini didukung dengan penelitian yang dilakukan Bui dkk. (2006) yang melaporkan bahwa mencit model kanker memiliki frekuensi sel T regulator lebih tinggi dibandingkan dengan mencit non-tumor pada organ limpa dan nodus limpatik. Peningkatan jumlah relatif sel T regulator CD4⁺CD25⁺ pada mencit model kanker payudara terjadi akibat sel banyak mengalami aktivasi dan proliferasi. Inflamasi kronik yang terjadi pada lingkungan kanker payudara dapat menyebabkan

peningkatan dan proliferasi sel-sel imunokompeten. Hal ini menyebabkan sel T CD4⁺ yang teraktivasi membutuhkan banyak molekul CD25⁺ agar dapat berikatan dengan IL-2, sehingga berperan penting dalam supresi respon imun pada kanker. Hal ini dilakukan dengan menurunkan produksi sitokin yang berperan dalam menekan pertumbuhan tumor (Lu, 2009; Hernandez dkk., 2013).

Peningkatan ekspresi CD25⁺ pada populasi sel T CD4⁺ juga terjadi karena peningkatan produksi ROS dalam keadaan stres oksidatif pada kanker. Produksi ROS oleh sel kanker dan *tumor-associated macrophages* (TAMs) mengakibatkan akumulasi Treg sehingga mampu mensupresi respon imun (Lin dkk., 2013; Chen dkk., 2016). Kondisi kanker memiliki level ROS dan jumlah sitokin proinflamasi yang tinggi akan menginduksi aktivasi NF-κB (Xia dkk., 2014). Ruan & Chen (2012) menyatakan bahwa NF-κB mengatur aktivasi dari sel T regulator, karena adanya penurunan jumlah Treg pada mencit tanpa NF-κB. NF-κB berperan dalam perkembangan dan proliferasi dari sel limfosit T.

Pemberian ramuan Cheral pada mencit model kanker payudara menunjukkan jumlah relatif dari populasi sel T regulator pada mencit model kanker payudara mengalami penurunan yang signifikan ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan mencit kanker. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa penurunan sel T CD4⁺CD25⁺ pada mencit perlakuan cisplatin dan ramuan Cheral mendekati kondisi mencit sehat. Hal ini ditunjukkan dengan tidak ada perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan dan kontrol sehat. Perlakuan dosis 3 memberikan pengaruh yang lebih baik jika dibandingkan dengan pemberian cisplatin dan dosis 1 ataupun dosis 2 (Gambar 7).

Penurunan jumlah relatif sel T regulator ditandai dengan menurunnya ekspresi molekul CD25⁺ pada populasi sel T CD4⁺. Pemberian cisplatin mampu menurunkan jumlah relatif sel T regulator, karena cisplatin sebagai kemoterapi mengandung platinum yang menunjukkan sifat lymfopaenia. Berbagai penelitian pre-klinikal menunjukkan bahwa kemoterapi mampu menginduksi kematian sel di tumor dengan meningkatkan presentasi antigen dan menekan populasi sel T regulator. Kemampuan ini mengakibatkan meningkatnya imunitas anti-tumor sehingga mampu menghambat pertumbuhan sel kanker (Nowak dkk., 2003; Lake & Robinson; 2005; Zitvogel dkk., 2010; Rettig dkk., 2011). Kerja kemoterapi yang tidak spesifik pada hanya pada sel kanker sehingga, menimbulkan berbagai efek samping. Hal ini menyebabkan dikembangkannya berbagai obat alternatif dari bahan alami. Pemberian ramuan Cheral menunjukkan hasil yang tidak berbeda dengan pemberian



Gambar 7. Kemampuan Cheral menurunkan jumlah relatif Sel T CD4⁺CD25⁺ pada setiap kelompok perlakuan: A) Dot plot hasil analisis *flow cytometry*, B) Histogram hasil uji statistik. Keterangan : K_sehat = mencit sehat; K_kanker = mencit kanker; CISP = mencit kanker dengan Cisplatin; D1 = mencit kanker dengan Cheral 1,233 mg/kg BB; D2 = mencit kanker dengan Cheral 2,466 mg/kg BB; D3 = mencit kanker dengan Cheral 4,932 mg/kg BB. Data diperoleh dari rata-rata ± SD pada setiap kelompok perlakuan dengan p value ≤ 0,05. Huruf yang berbeda menunjukkan adanya beda nyata berdasarkan hasil uji Tukey HSD.

cisplatin, namun dipercaya tidak menimbulkan efek samping karena berasal dari bahan alami. Ramuan Cheral yang terdiri atas Temu Putih (*Curcuma zedoaria*) dan Meniran (*Phyllanthus niruri*) mengandung Flavonoid dan polifenol seperti curcumin dan *phyllantin*.

Cheral yang terdiri atas Temu Putih (*Curcuma zedoaria*) dan Meniran (*Phyllanthus niruri*) memiliki kandungan senyawa alami flavonoid dan polifenol. Curcumin menjadi salah satu polifenol yang umumnya ditemukan pada Genus *Curcuma*. Curcumin mampu untuk menurunkan jumlah relatif Sel T regulator melalui *down-regulation* dari CTLA-4. Populasi Sel T regulator mampu mengekspresikan CTLA-4 pada permukaan selnya kemudian berikatan dengan molekul B7 sehingga menginduksi sinyal transduksi dari sel T regulator. Penurunan dari ekspresi CTLA-4 pada permukaan sel T regulator dapat terjadi karena CTLA-4 merupakan faktor penting dalam regulasi supresi aktivitas dari Sel Treg. Mekanisme lain yakni Curcumin mampu menurunkan *nuclear translocation* pada p65 dan cRel di populasi Sel T regulator (Read dkk., 2000; Vang dkk., 2010; Zhao dkk., 2012). Meniran memiliki kandungan fitokimia seperti *Phyllantin* dan Flavonoid yang memiliki kemampuan untuk memodulasi dan aktivasi dari sistem imun. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa Flavonoid mampu menurunkan level ekspresi molekul CD25 dan IL-2. Flavonoid memiliki kemampuan menangkap radikal bebas sehingga mampu menurunkan level ROS, sehingga menekan aktivasi NF- κ B. Penurunan aktivitas NF- κ B mengakibatkan penurunan ekspresi sitokin proinflamasi seperti IL-1 β , IL-2, IL-6 dan TNF- α (Maroon dkk., 2010; Leyva-Lopez dkk., 2016).

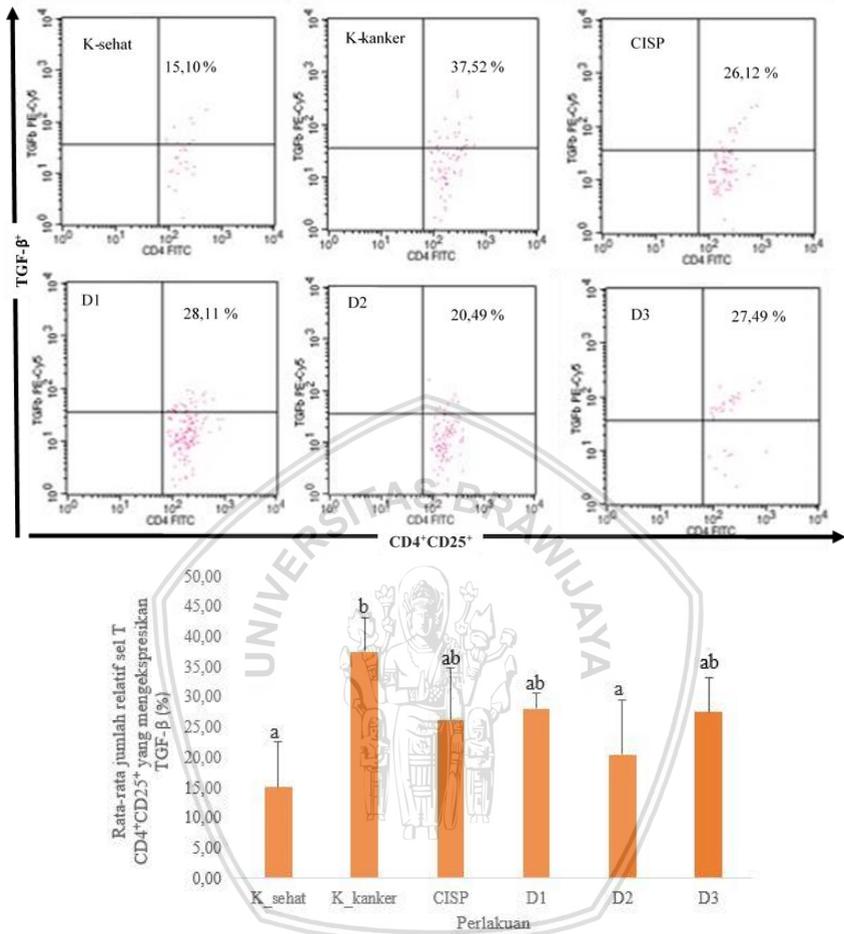
4.3 Pengaruh Ramuan Cheral terhadap Jumlah Relatif Sel T CD4⁺CD25⁺ yang mengekspresikan TGF- β

Sitokin TGF- β dapat diproduksi dari sel tumor, sel trombosit dan sel limfosit. Sel T regulator yang telah teraktivasi mampu mengekspresikan TGF- β . Sitokin TGF- β mempunyai peran untuk meregulasi proliferasi, diferensiasi dan kematian sel (Sun dkk., 2016; Barcellos-Hoff & Rosemary, 2009; Rifa'i, 2012). Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah relatif sel T CD4⁺CD25⁺ yang mengekspresikan TGF- β diketahui mengalami peningkatan pada kelompok kontrol DMBA dibandingkan kelompok kontrol sehat secara signifikan ($p < 0,05$) (Gambar 8). Peningkatan ekspresi dari TGF- β diketahui terjadi pada kanker payudara, ovarium, endometrial dan melanoma. Peran TGF- β dalam perkembangan

kanker diketahui berhubungan dalam proses invasi dan metastasis sel kanker (Tsuhiwa dkk., 2001; Fabregat dkk., 2014; Zu dkk., 2012).

Peningkatan TGF- β dalam kondisi kanker pada penelitian ini berhubungan dengan tingginya jumlah relatif sel T regulator. Sel T regulator yang mengekspresikan TGF- β akan menjaga keadaan homeostatisnya dengan mensekresikan sikokin. Sitokin TGF- β dapat memicu diferensiasi sel T CD4 naive menjadi sel T regulator. Berdasarkan hal ini dapat dikatakan bahwa adanya peningkatan pada sel T regulator berbanding lurus dengan peningkatan yang terjadi pada sel jumlah relatif sel T CD4⁺CD25⁺ yang mengekspresikan TGF- β (Wan Jun, 2011). Kondisi kanker payudara menyebabkan peningkatan kadar ROS akibat adanya inflamasi kronis yang terjadi dalam tubuh. Kadar ROS yang meningkat mampu memediasi ekspresi dari TGF- β melalui berbagai jalur signaling seperti jalur Smad2 yang lebih sensitif terhadap ROS. (Li dkk., 2004; Kristic dkk., 2015). ROS dapat mempengaruhi jalur aktivasi NF- κ B secara dependet dengan melakukan dimerisasi IKK. Aktivasi kompleks IKK dapat terjadi karena molekul IKK fosfatase sangat sensitif terhadap adanya ROS sehingga fosforilasi dari IKK akan menginduksi aktivasi dari NF- κ B (Morgan & Liu, 2011). Efek immunosupresan dari TGF- β mendukung perkembangan tumor, karena TGF- β mampu menghambat faktor transkripsi pro-apoptosis seperti granzime A dan B, perforin dan FAS ligand pada sel T sitotoksik. TGF- β dapat menghambat fungsi dari APC sehingga menurunkan aktivasi sel T CD4⁺, CD8⁺ dan sel NK (Thomas & Massague., 2005; Cheng dkk., 2008; Meulmeester dkk., 2011).

Pemberian dosis ramuan Cheral menunjukkan hasil cukup efektif untuk menekan respon immunosupresif pada mencit kanker payudara yang diketahui dari parameter TGF- β . Ekspresi TGF- β oleh sel T CD4⁺CD25⁺ diketahui mengalami penurunan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol kanker secara signifikan ($p < 0,05$). Penurunan ekspresi TGF- β dari perlakuan dosis 2 menunjukkan menyerupai kondisi ekspresi TGF- β pada kelompok kontrol sehat. Hal ini diketahui dari tidak ada perbedaan yang signifikan diantara kedua kelompok perlakuan (Gambar 8). Ramuan Cheral mampu menghambat efek immunosupresi sehingga menghambat perkembangan kanker payudara. Pemberian cisplatin juga menunjukkan adanya penurunan jika dibandingkan dengan kontrol kanker ($p < 0,05$). Mekanisme kerja cisplatin yang berikatan dengan DNA sehingga mampu menyebabkan terjadinya apoptosis. Selain itu, pemberian cisplatin meningkatkan level protein caspase-3 yang berperan penting dalam



Gambar 8. Kemampuan Cheral menurunkan jumlah relatif Sel T CD4⁺CD25⁺ yang mengekspresikan TGF-β pada setiap kelompok perlakuan: A) Dot plot hasil analisis *flow cytometry*, B) Histogram hasil uji statistik. Keterangan : K_sehat = mencit sehat; K_kanker = mencit kanker; CISP = mencit kanker dengan Cisplatin; D1 = mencit kanker dengan Cheral 1,233 mg/kg BB; D2 = mencit kanker dengan Cheral 2,466 mg/kg BB; D3 = mencit kanker dengan Cheral 4,932 mg/kg BB. Data diperoleh dari rata-rata ± SD pada setiap kelompok perlakuan dengan p value ≤ 0,05. Huruf yang berbeda menunjukkan adanya beda nyata berdasarkan hasil uji Tukey HSD.

program apoptosis (Dasari & Paul, 2014). Hal ini didukung dengan fakta penelitian yang melaporkan bahwa penggunaan cisplatin pada pasien kanker serviks mampu menurunkan jumlah populasi dari sel T regulator, sel *natural killer* dan TGF- β (Bachtiary dkk., 2005; Ramesh & Brian, 2002).

Ramuan Cheral yang terdiri atas Temu Putih (*C. zedoaria*) mempunyai kandungan fitokimia seperti Curcumin. Curcumin mampu menurunkan TGF- β karena adanya mekanisme *down regulation* dari beberapa jalur sinyaling. Hal ini menyebabkan menurunnya jumlah reseptor TGF- β II dan mempengaruhi jalur Smad3 dan Smad4 sehingga jumlah relatif dari ekspresi TGF- β oleh sel T regulator dapat menurun (Thacker & Karunagaran, 2015). Kandungan Flavonoid dan polifenol dalam ramuan Cheral diduga mampu menurunkan ekspresi TGF- β . Kandungan Flavonoid dan tanin memiliki aktivitas *free radical scavenging* yang mampu menghambat radikal bebas. Proses *free radical scavenging* dilakukan dengan memberikan satu atom hidrogen untuk bereaksi dengan radikal bebas (Shinde dkk., 2013; Amic dkk., 2003). Hal ini menyebabkan kadar ROS dapat menurun sehingga, menurunkan aktivator yang menginduksi ekspresi TGF- β oleh sel T CD4⁺CD25⁺. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa TGF- β yang diekspresikan oleh Treg juga diketahui mampu mempengaruhi sel Treg itu sendiri. Hal ini menyebabkan level TGF- β dalam tubuh memiliki kecenderungan sebanding dengan frekuensi Treg (Zu dkk., 2012).

4.4 Pengaruh Ramuan Cheral terhadap Jumlah Relatif Sel B

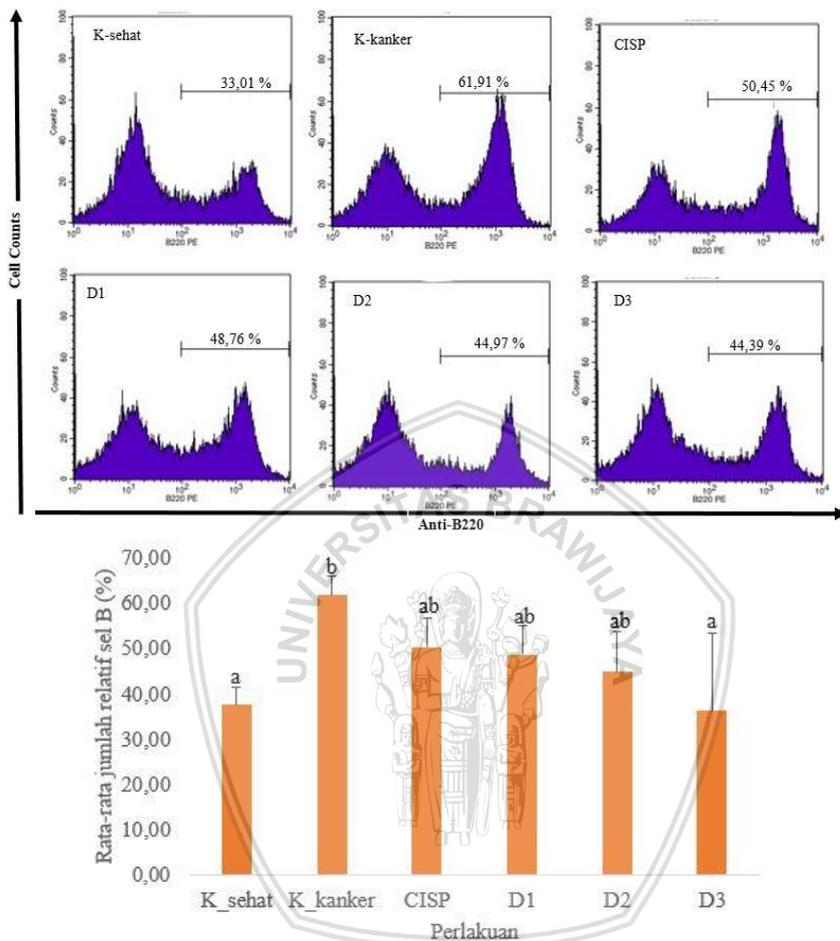
Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ramuan Cheral mampu mempengaruhi populasi dari sel B. Salah satu *marker* molekuler sel B adalah B220. Sel B berperan dalam memproduksi antibodi dan meregulasi homeostatis serta, mensekresikan sitokin (Cascalho dkk., 2000; Fremd dkk., 2013). Pada kontrol kanker menunjukkan jumlah relatif sel B tertinggi jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan kontrol sehat ($p < 0,05$). Kelompok perlakuan cisplatin, dosis 1 dan dosis 2 menunjukkan penurunan secara signifikan jika dibandingkan dengan kontrol kanker ($p < 0,05$) (Gambar 9). Pemberian ramuan Cheral dosis 3 menunjukkan hasil yang paling baik karena kondisinya dapat menyerupai kondisi kontrol sehat yang ditandai dengan tidak adanya perbedaan yang nyata antara dua kelompok perlakuan ($p < 0,05$).

Jumlah Sel B yang meningkat dibutuhkan oleh tubuh sebagai bentuk perlawanan terhadap antigen tumor. Tubuh akan memproduksi banyak

antibodi yang berguna sebagai penanda spesifik dan pengenal dari antigen tumor kepada Sel NK dan sel makrofag. Sel NK akan mampu mengenali antibodi yang telah melapisi sel kanker. Sel NK yang mengekspresikan FcR yang mampu mengikis sel kanker yang terlapisi antibodi serta, mampu membunuh sel tumor secara langsung. Eliminasi sel tumor dilakukan dengan pelepasan protease, perforin dan granzim. Sel NK akan mampu membunuh sel kanker yang memiliki MHC-I yang telah termutasi (Baratawidjaja & Iris, 2013).

Sel kanker memiliki kemampuan untuk meloloskan diri dari eliminasi oleh sistem imun, salah satunya dengan memanfaatkan sifat immunosupresant dari beberapa sel imun seperti sel B. Tumor antigen yang dipresentasikan oleh sel B dapat menyebabkan toleransi dan memediasi Fas ligan sehingga menyebabkan penurunan jumlah sel T CD8⁺ (Bennett dkk., 1998; Qin dkk., 1998). Salah satu aktivitas dari sel limfosit B yang mengalami peningkatan dalam kondisi kanker adalah aktivitas dalam produksi sitokin IL-10 dan IL-6. Produksi sitokin pro-inflamasi seperti IL-10 dan IL-6 mengakibatkan peningkatan inflamasi (Qin dkk., 1998; Perricone dkk., 2004; Baratawidjaja & Iris, 2013). Penelitian Trikha dkk. (2003) menyatakan bahwa pada kondisi kanker terjadi peningkatan IL-6 yang berperan dalam peradangan dan stimulasi proliferasi sel kanker. Aktivasi sel B yang diikuti dengan produksi sitokin proinflamasi akan memperparah terjadinya inflamasi sehingga semakin mendukung pertumbuhan kanker payudara. Mencit yang terkena kanker payudara salah satunya akibat pemberian DMBA, dalam tubuhnya akan terdapat banyak ROS. Level ROS yang tinggi ini akan mengakibatkan perubahan mekanisme dalam tubuh sehingga terjadi perubahan siklus sel dan meningkatkan sekresi sitokin proinflamasi (Ke dkk., 2015). Kanker payudara diketahui mempengaruhi berbagai jalur salah satunya adalah jalur NF- κ B. Aktivitas NF- κ B diperlukan sebagai salah satu regulator perkembangan dan aktivasi sel-sel imunokompeten seperti sel B. Faktor ini yang menjadi salah satu mekanisme peningkatan sel B dalam kondisi kanker payudara (Feng dkk., 2004; Defuria dkk., 2013).

Penurunan jumlah populasi sel limfosit B diperlukan pada penderita kanker payudara. Hal ini dibuktikan dengan fakta penelitian yang dilakukan Inoue dkk. (2006) yang menunjukkan bahwa pada mencit defisiensi sel B terjadi peningkatan respon anti-tumor yang ditandai dengan kenaikan sel T dan sel *natural killer*. Penelitian lain yang dilakukan pada mencit *knockout* sel B menunjukkan peningkatan respon sel limfosit T CD8 (McMahon & Raulet, 2001).



Gambar 9. Kemampuan ramuan Cheral menurunkan jumlah relatif Sel B pada setiap kelompok perlakuan: A) Histogram hasil analisis *flow cytometry*, B) Histogram hasil uji statistik. Keterangan : K_sehat = mencit sehat; K_kanker = mencit kanker; CISP = mencit kanker dengan Cisplatin; D1 = mencit kanker dengan Cheral 1,233 mg/kg BB; D2 = mencit kanker dengan Cheral 2,466 mg/kg BB; D3 = mencit kanker dengan Cheral 4,932 mg/kg BB. Data diperoleh dari rata-rata \pm SD pada setiap kelompok perlakuan dengan p value $\leq 0,05$. Huruf yang berbeda menunjukkan adanya beda nyata berdasarkan hasil uji Tukey HSD.

Hasil penelitian menunjukkan pemberian ramuan Cheral juga mampu menurunkan jumlah relatif sel B pada limpa terutama terjadi karena adanya kandungan Flavonoid dan polifenol. Kedua senyawa ini diketahui memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan dari Flavonoid dan polifenol menyebabkan jumlah ROS yang dihasilkan dalam kondisi kanker payudara dapat berkurang. Jumlah ROS yang berkurang dapat menyebabkan penurunan aktivitas NF- κ B sehingga mampu menurunkan jumlah sel limfosit B (Korn dkk., 2001; Vidigal dkk., 2012). Kandungan Curcumin dan *Phyllantin* juga terbukti mampu menghambat proliferasi dari sel B yang menyebabkan jumlah relatif Sel B menurun. Curcumin mempunyai kemampuan untuk menghambat BKS-2, dan menghambat ekspresi dari gen *c-myc* dan *egr-1* (Han dkk., 1999) Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Wijayahadi dkk. (2007) menyatakan bahwa terdapat penurunan jumlah sel limfosit B setelah pemberian kemoterapi pada pasien kanker prostat. Penurunan jumlah relatif sel setelah pemberiaan cisplatin dapat terjadi karena kerja obat yang mentargetkan sel-sel yang aktif membelah. Sel-sel imunokompeten akan aktif membelah sebagai respon terhadap perkembangan kanker sehingga pemberian cisplatin akan menurunkan jumlah relatif sel B (Tan dkk., 2002, Schluns dkk., 2000). Berdasarkan uraian tersebut, dapat diketahui bahwa pemberian cisplatin dan Cheral dapat menurunkan jumlah relatif sel B setelah pemberian cisplatin dan ramuan Cheral.

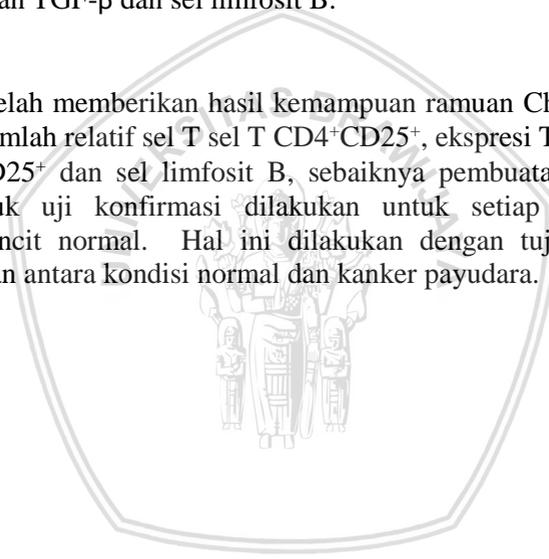
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Ramuan Cheral yang diberikan pada mencit model kanker payudara mampu menurunkan jumlah relatif sel T $CD4^+CD25^+$, ekspresi TGF- β oleh sel T $CD4^+CD25^+$ dan sel limfosit B dibandingkan kelompok kanker. Kondisi kanker memiliki jumlah relatif sel T regulator, sel T regulator yang mengekspresikan TGF- β dan sel B yang tinggi. Pemberian cisplatin juga mampu menurunkan jumlah relatif sel T regulator namun, memiliki kecenderungan meningkatkan jumlah relatif sel T regulator yang mengekspresikan TGF- β dan sel limfosit B.

5.2 Saran

Penelitian telah memberikan hasil kemampuan ramuan Cheral untuk menurunkan jumlah relatif sel T sel T $CD4^+CD25^+$, ekspresi TGF- β oleh sel T $CD4^+CD25^+$ dan sel limfosit B, sebaiknya pembuatan preparat histology untuk uji konfirmasi dilakukan untuk setiap perlakuan khususnya mencit normal. Hal ini dilakukan dengan tujuan untuk membandingkan antara kondisi normal dan kanker payudara.



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Andrew H. L., & Shiv P. 2015. **Basic Immunology: Function and Disorders of Immune System**. Elsevier. Kanada.
- Adamowska, U. & Sean M. 2005. **Anatomy and Pathology**. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
- Aggarwal, B.B & Shishodia S. 2006. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology*. 71 (10) :1397–1421.
- Alderden, R.A., Matthew D. H. & Trevor W. H. 2006. The discovery and development of cisplatin. *J. of chem, education*. 88(5): 728- 734.
- Allaman, D. & Pillai, S. 2008. Peripheral B cell subsets. *Curr. Opin. Immunol*. 20: 149-157.
- Anderson, W.F. 2000. Gene Therapy Scores against Cancer. *Nature Med*. 6(8): 862-86.
- Andreachek, E.R. & Muller W.J. 2000. Tyrosine kinase signaling in breast cancer: Tyrosine kinase-mediated signaling transduction in transgenic mouse models of human breast cancer. 2: 211-216.
- Ansari M.H. & Ahmad S. 1991. *Curcuma zedoaria* root extract: *in vitro* demonstration of antiamebic activity. *Biomed. Res.* 2 (2): 192–196.
- Ashkenazi, A. 2008. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nat. Rev. Drug Discovery*. 7 :1001-1012.
- Bachtiary, B., Irene H., Thomas Z., Thomas H.K., Johannes D., Richard P. & Michael M. 2005. Impact of Radiotherapy with and without current cisplatin on lymphocyte subpopulations in cervical cancer patients. *Anticancer research*. 25: 4673-4678.
- Bagalkotkar, G., S. R. Sagineedu., M.S. Saad & J. Stanslas. 2006. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. And their pharmacological properties: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 58: 1559-1570.
- Baratawidjaja, K.G. & Iris R. 2013. **Imunologi dasar**. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Barcellos-Hoff, M.H. & Rosemary J.A. 2009. Transforming growth factor- β in breast cancer. *Breast Cancer Research*. 11: 202-208.
- Bie`che, I. & Rosette L. 2011. Genome-based and transcriptome-based molecular classification of breast cancer. *Current opinion in Oncology*. 23: 93-99.

- Biragyn A., & Longo D.L. 2012. Neoplastic “Black Ops”: cancer’s subversive tactics in overcoming host defenses. *Semin Cancer Biol.* 22(1): 50-59.
- Bronte, V & M. J. Pittet. 2013. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity.* 39: 806-818.
- Bui, J.D., Ravindra U., Chyi-song H. & Robert D.S. 2006. Comparative analysis of regulatory and effector cells in progressively growing versus rejecting tumors of similar origins. *Cancer res.* 66(14): 7301-7311.
- Burkholder, B., Ren-Yu H., Rob B., Shuhong L., Valerie S.J., Wenji Z., Zhi-Qiang L., Chang-Yu G., Bao-Ling W., Yu-Ming Z., & Rou-Pan, H. 2014. Tumor-induced perturbation of cytokines and immune cell network. *Biochemistry Et. Bio Physic Acta.* 1845: 182-201.
- Calaf, G.M. & Carlos E.C. 2012. Synergistic effect of malathion and esterogen on mammary gland carcinogenesis. *Oncology reports.* 28: 640-646.
- Cascalho, M., Jamie W., Jeffrey B., Hans-Martin J., Charles S & Matthias W. 2000. A B220⁺, CD19⁺ population B cells in the peripherl blood of quasimonoclonal mine. *International immunology.* 12(1): 29-35.
- Calixto, J.B., A.R. Santos, V. Cechinel Filho & R.A. Yunes. 1998. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology and therapeutic potential. *Med. Res. Rev.* 18: 225–258.
- Chaudary, B. & Eyad E. 2016. Regulatory T cells in the tumor microenvironment and cancer progression: role and therapeutic targeting. *Vaccines.* 4: 28-63.
- Chen, Y., Feng H., Long-hui C., Cheng L., Jian-wei W., Wei Z., Zhi-xing G., An-hua L., & Jian-hua Z. 2015. Dose-response relationship in cisplatin-treted breast cancer xenografts monitored with dynamic contrast-enhanced ultrasound. *BMC Cancer.* 15:136-145.
- Chen, X., Mengjia S., Bin Z., & Yi Z. 2016. Reactive oxygen species regulate T cell immune response in the tumor microenviroment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* ID 1580967.
- Cheng, N., Chytil A., & Shyr Y. 2008. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res.* 6(10):1521–33.
- Coombes, J. L., Siddiqui, K. R., Arancibia-Carcamo, C. V., Hall, J., Sun, C. M., Belkaid, Y., & Powrie, F. 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T

- cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 204, 1757–1764.
- Dabbs, D.J. 2017. **Breast Pathology**. Elsevier. Philadelphia.
- Dasari, S., & Paul, B.T., 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J. Pharmacol.* 5: 364-378.
- DeNardo, D.G & Coussens, L.M. 2007. Balancing immune response:crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Can Res.* 9:212-222.
- De Visser, K.E., Korets L.V., & Coussens L.M. 2005. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell.* 7:411–423.
- DuPre, S.A., Redelman D., & Hunter K.W. Jr. 2007. The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci. *Int J Exp Pathol.* 88:351–360.
- Fabregat, I., Joan F., Jessica M & Patricia S. 2014. TGF-beta signaling in cancer treatment. *Current Pharmaceutical Design.* 20(17): 2934-2947.
- Fan, C., D. S. Oh, & L. Wessels. 2006. Concordance among gene expression- based predictors for breast cancer. *The New England Journal of Medicine.* 355 (6):560–569.
- Ferlay, J., Soerjomataram I., Ervik M., Dikshit R., Eser S., & Mathers C.. 2013. **GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase** .International Agency for Research on Cancer. Paris.
- Fremd, C., Florian S., Christof S., Philipp B. & Chrostoph D. 2013. B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients. *Oncolimmunology.* 2(7): e25443.
- Frezza, M., Sarmad, H. Di Chen, Andrew D., Sara S., Dajena., & Q. Ping Dou. 2010. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Curr. Pham Des* 16(6): 1813-1825.
- Gao, Z., Xu H., Chen X., & Chen H. 2003. Antioxidant status and mineral content in tissues of rutin and baicalin rats. *Life Sci.* 73:1599-1607.
- Ghoncheh, M, Zahra P., & Hamid S. 2016. Incidence and mortality and epidemiology of breast cancer in the world. *Asian Pac J Cancer Prev.* 17: 43-46.
- Gobert, M., Treilleux, I., Bendriss-Vermare, N., Bachelot, T., Goddard-Leon, S., Arfi, V., Biota, C., Doffin, A. C., Durand, I., Olive, D., Perez, S., & Pasqual, N. 2009. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates

- surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res.* 69:2000–2009.
- Gogola, T.V., & Jeffrey M.R. 2007. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Cancer.* 7: 660-672.
- Hakensen, V.D. 2011. **Biology of The normal breast: relation to mamographic density and risk of breast cancer.** Universitas of Oslo. Norway.
- Halliwell, B., & J. M. C. Gutteridge. 2000. **Free radical in biology and medicine.** Oxford University Press. New York
- Hamdi, O.A.A., Syarifah N.S.A.R., Khalijah A., Norhanon A.W., Chung Yeng L., Noel F.T. & Sri Nurestri A.M. 2014. Cytotoxic constituents from the rhizomes of *Curcuma zedoaria*. *The Scientific World Journal.* 11: e 321943.
- Han, S.S., Chung S.T., Darrell S.R., Dinesh R., & Subbarao B. 1999. Curcumin causes the growth arrest and apoptosis of B cell lymphoma by downregulation of egr-1, C-myc, Bcl-X, NF-κB and p53. *Clinical immunology.* 93(2): 152-161.
- Hassioktou, F. & Donna G. 2013. Anatomy of the human mammary gland: current status of knowledge. *Clinical anatomy.* 26:29-48.
- Hernandez, D.F.M., M.A. Franco M., E. Mendoza G., P. Zatapa B., C.A. Sierra R., E.E. Coronado C., A.G. Rosas T., R.S.Tamez G & C. Rodriguez P. 2013. Expression of Foxp3, CD25 and IL-2 in the B16F10 cancer cell line and melanoma is correlated with tumor growth in mice. *Oncology Letters.* 6; 1195-1200.
- Huang, S.T., R.C. Yang, L.J. Yang, P.N. Lee & J.H.S. Pang. 2003. *Phyllanthus urinaria* triggers the apoptosis and Bcl-2 down-regulation in Lewis lung carcinoma cells. *Life Sci.* 72: 1705–1716.
- Inoue, S., Wolfgang W.L., Basil G., & Dorothy S. 2006. Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. *Cancer Res.* 66(15): 7741-7747.
- Jacobs, Lisa & Chistina F. 2011. **Early diagnostic and treatment of cancer.** Saunders Elsevier. Philadelphia.
- Jayakumar, J.K., Nirmala, P, Kumar, B.A.P., & Ashok, P.K. 2014. Evaluation of protective effect of myricetin, a bioFlavonoid in dimethyl benzantracene-induced breast cancer in female Wistar rats. *South Asian Journal of Cancer.* 3(2):107-111.
- Jeziarska-Drutel, A., Steven A. R., & Carola A. N. 2013. Role of oxidative stress and the microenvironment in breast cancer development and progression. *Advances in cancer research.* 119: 107–125.

- Junor, R.F, DE a Araujo, Luiz, A. L.S. Cinthia R. Ranniere G. Hugo G. G., Pedro Ros P., Tatiane P. Aurigena A. Gerlane C.B.G. 2012. Growth inhibitory effects of *Phyllanthus niruri* extracts in combination with cisplatin on cancer cell lines. *World J, Gastroenterol.* 18(31): 4162-4168.
- Kabel, A.M. & Fahad H.B. 2015. Breast cancer; insights into risk factors, pathogenesis, diagnosis and management. *Cancer Res Treat.* 3(2) : 28-33.
- Kardinan, A & Fauzi, R.K. 2004. **Meniran Penambah Daya Tahan Tubuh Alami.** Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Kawaki, Y., Tomonori Y., Hidetoshi S. Chei Kudo, S., Tomoko I. Shoko N., Takahiro T, Jeong, H.P., Boryana K., Junichiro M & Naoshi K. 2013. *Front. Oncol.* 13: 134-142.
- Kementrian Kesehatan RI. 2013. Situasi penyakit kanker. <http://www.depkes.go.id/resources/download/pusdatin/infodatin/infodatin-kanker.pdf>. Diakses 20 Mei 2017.
- Kim, K.I., Kim, J.W., Hong, B.S., Shin, D.H., Cho, H.Y., Kim, H.K. & Yang, H.C. 2000. Antitumor, genotoxicity and anticlastogenic activities of polysaccharide from *Curcuma zedoaria*. *Mol. Cells.* 10: 392-398.
- Kokan, T., & J. Tsumura. 1988. Antitumor proteinbound polysaccharides form curcuma plants. *Jpn Kokai Tokyo Koho* 60: 428.
- Kristic, J., Tricanovic D., Mojsilvonic S., Santibanez J.F. 2015. Transforming growth factor-beta and oxidative stress interplay: implications in tumorigenesis and cancer progression. *Oxid Med Cell Longev.* PMID: PMC4452864.
- Lai, E.Y.C., Chyau C., Jeng-Leun M., Chien-Chou C., Yi-jui L., Ching-Fang S., & Long-Liu L. 2004. Antimicrobial activity and cytotoxicity of the essential oil of *Curcuma zedoaria*. *Am J Chin Med.* 32(2): 281-290.
- Lai, P.K. & Roy J. 2004. Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. *Current Medicinal Chemistry.* 11 (11): 1451–1460.
- Lake, R.A., & Robinson B.W. 2005. Immunotherapy and chemotherapy—a practical partnership. *Nat Rev Cancer.* 5(5): 397–405.
- Laksmi, S., G. Padmaja & P. Remani. 2011. Antitumor effects of isocurcumenol isolated from *Curcuma zedoaria* rhizomes on human and murine cancer cells. *International Journal of Medicinal Chemistry.* <http://dx.doi.org/10.1155/2011/253962>.

- Lee, J.J., Lee, J.H., Ko Y.G., Hong S.I. & Lee J.S. 2009. Prevention of premature senescence requires JNK regulation of Bcl-2 and reactive oxygen species. *Oncogene*. 29: 561-575.
- Leyva-Lopez, N., Erick P.G., Dulce L.A. & J. Basilio H. 2016. Flavonoids as cytokine modulators: A possible therapy for inflammation-related diseases. *Int J Mol Sci*. 17 : 921- 936.
- Li, Ming O., Yisong Y. Wan, Shomyseh Sanjabi, Anna-Karin L. R & Richard A. F. 2006. Transforming growth factor- β regulation of immune responses. *Annual Review of Immunology*. 24: 99-146.
- Li, W.Q., H. Y. Qureshi, A. Liacini, F. Dehnade, & M. Zafarullah. 2004. Transforming growth factor β 1 induction of tissue inhibitor of metalloproteinases 3 in articular chondrocytes is mediated by reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*. 37(2): 196–207.
- Lin, X., Wei Z., Jing L., Ya Z., Haohan Q., Haochen W., Bin X., Yan L. & Pingping S. 2013. Oxidative Stress in Malignant Melanoma Enhances Tumor Necrosis Factor- α Secretion of Tumor-Associated Macrophages That Promote Cancer Cell Invasion. 19(12): 1337-1355.
- Liska, J. Julius B., Michal D., Dana M., Viktoria K., Stefan P., & Eduard U. 2016. Relationship between histology, development and tumorigenesis of mammary gland infemale rat. *Exp. Anim*. 65(1): 1-9.
- Lu, H. 2009. FOXP3 expression and prognosis: role of both the tumor and T cells. *J Clin Oncol*. 27:1735-1736.
- Mangan, Y. 2009. **Solusi sehat mencegah dan mengatasi kanker**. AgroMedia Pustaka. Jakarta.
- Manjrekar, A.P, Jisha V., Bag P.P, Adhikary B., Pai M.M., & Hedge A. 2008. Effect of *Phyllanthus niruri* Linn. treatment on liver, kidney and testes in CCl4 induced hepatotoxic rats. *Indi J Experimen Bio*. 46:514-520.
- Marieb, K & Katja H. 2013. **Human anatomy & physiology**. Pearson Education. New York.
- Maroon, J.C., Bost, W.Y., & Maroon A. 2010. Natural anti-inflammatory agents for pain relief. *Surg. Neurol Int*. 1:80.
- McMahon, C.W., & Raulet D.H. 2001. Expression and function of NK cell receptors in CD8+ T cells. *Curr Opin Immunol*. 13:465–470.
- Mendes, F., Catia D., Paulo, R-S., Ana M.A. Ana C.G., Jessica E., Jaoa E., Ana S.P., Mafalda L., Vera A., Ricardo T., Ana B. S, Maria,

- F.B. & Manuel S.R. 2016. The role immune system exhaustion on cancer cells escape and anti-tumor immune induction after irradiation. *Reviews on Cancer*. 2: 2- 32.
- Meulmeester, E., Ten Dijke P. 2011. The dynamic roles of TGF-beta in cancer. *J Pathol*. 223(2): 205–218.
- Miller, R.P., Raghu K.T, Ganesan R & William B.R. 2010. Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity. *Toxins*. 2: 2490-2518.
- Mohan, Harsh. 2010. **Text Book of Pathology**. Sixth Edition. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) LTD. New York.
- Morgan, M.J. & Z.-G. Liu. 2011. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Research*. 21(1): 103-115.
- Nowak, A.K., Lake R.A., Marzo A.L., Scott B., Heath W.R., Collins E.J., Frelinger J.A., & Robinson B.W. 2003. Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells. *J Immunol*. 170(10): 4905–4913
- Nurhayati N. 2010. **Isolasi, Identifikasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Fenolik dari Rimpang Temu Putih (*Curcuma zedoaria* Rosc)**. Airlangga University. Surabaya.
- Ohara, M., Yamaguchi Y., Kazuo M., Shigeru M., Arihiro K., & Okada M. 2009. Possible involvement of regulatory T cells in tumor onset and progression in primary breast cancer. *Cancer Immunology*. 58 (3) :441-447.
- Olkhanud P.B., Baatar D., Bodogai M., Hakim F., Gress R., & Anderson R.L. 2009. Breast cancer lung metastasis requires expression of chemokine receptor CCR4 and regulatory T cells. *Cancer Res*. 69:5996–6004.
- Olkhanud P.B., Bazarragachaa D., Monica B., Ronald E. G., Ranjan S., Katrzyana W., Enkhzol M, Robert P.W. & Arya B. 2011. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4+ T cells to T regulatory cells. *Cancer Res*. 71 (10): 3505-3515.
- Park, H.Y., L. M. Wakefield, & M. Mamura. 2009. Regulation of tumor immune surveillance and tumor immune subversion by TGF- β . *Immune Network*. 9(4): 122–126.
- Perricone, M.A., Smith K.A., & Claussen K.A. 2004. Enhanced efficacy of melanoma vaccines in the absence of B lymphocytes. *J Immunother*. 27:273–281.
- Petroianu, A. 2011. **The spleen**. Bentham Science Publisher. Brazil.

- Pinmai, K., Chunlaratthanabhorn S., Ngamkitidechakul C, Soonthornchaeron N, Nahnvajanawong C. 2008. Synergistic growth inhibitory effect of *Phyllanthus emblica* and *Terminalia bellerica* extract with conventional cytotoxic agents: doxorubicin and cisplatin against human hepatocarcinoma and lung cancer cells. *World J. Gastroenterol.* 14: 1491-1497.
- Pollard, J.W. 2004. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer.* 4(1): 71-78.
- Qin, Z., Richter G., Schuler T., Ibe S., Cao X., & Blankenstein T. 1998. B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat Med.* 4:627-30.
- Rahman, Syed Abdul, Abdul Wahab, N. & Abd Malek, S.N. 2013. In vitro morphological assessment of apoptosis induced by antiproliferative constituents from the rhizomes of *Curcuma zedoaria*. *Evidence Based Complement Alternat. Med.* 25:7108.
- Ramesh, G. & W. Brian R. 2002. TNF- α mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J. Clin. Invest.* 110: 835-842.
- Ratcliffe, Michael J.H., 2016. **Encyclopedia of Immunobiology.** Academic Press. Oxford.
- Read, S., Malmstrom V., & Powrie F. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays essential role in the function of CD25 (+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 192(2): 295-302.
- Rettig, L., Seidenberg S., Parvanova I., Samaras P., Knuth A., & Pascolo S. 2011. Gemcitabine depletes regulatory T-cells in human and mice and enhances triggering of vaccine-specific cytotoxic T-cells. *Int J Cancer.* 129(4): 832-838
- Rifa'i, M. 2012. **Imunologi dan Bioregulator.** Galaxy Sciences. Malang.
- Rifa'i, M. 2016. Perkembangan sel limfosit. <http://muhammadrifai.lecture.ub.ac.id/files/2011/01/BAB-III-PERKEMBANGAN-LIMFOSIT.pdf>. Diakses pada 1 Oktober 2017.
- Rodrig, S.J., Aliakbar S., Betty L., & David M.D. 2005. The CD45 isoform B220 identifies select subsets of human B cells and B-cell lymphoproliferative disorders. *Human pathology.* 36: 51-57.
- Rossai, J. 2011. **Rossai and Ackerman's Surgical Pathology.** Elsevier. Paris.

- Ruan, Q. & Chen Y.H. 2012. Nuclear factor- κ B in immunity and inflammation: the Treg and Th17 connection. *Adv Exp Med Biol.* 946: 207-221.
- Ruder, E.H., Dorgan J.F., Kransz S., Kris-Etherton P.M., & Hartman T.J. 2008. Examining breast cancer growth and lifestyle risk factor: early life, childhood and adolescence. 8(4): 334-342.
- Saikia N. & Nath S. C. 2003. Ethnobotanical observations of some species of the genus *Curcuma* L. growing in Assam. *Journal of Economic and Taxonomic Botany.* 27 : 430– 433.
- Sajja, A., Tomaino A., Trombetta D., Pellegrino M.L., Tita B., Messina C., Bonina F.P., Rocco C., Nicolosi G., & Castelli F. 2003. In vitro antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin ester. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56: 167-174.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi T., Nomura T., & Ono M. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 133: 775-787.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., & Toda M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155:1151–1164.
- Sakaguchi, S. 2009. Naturally arising Foxp3-expressing CD25-CD4-regulatory T cell in immunological tolerance to self and non-self. *J. Immunol.* 6: 345-352.
- Scheel, C., Tamer O., Antoine K & Robert A.W. 2007. Adaptation versus selection: The origins of metastatic behavior. *Cancer Res.* 64(24): 11476-11479.
- Schmidt, A., Oberle, N., & Krammer P.H. 2012. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Immunol. Rev.* 212: 8-27.
- Schreiber, R.D., Old, L.J. & Smyth, M.J. 2011. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Cancer.* 331: 1565-1569.
- Schluns, K.S., Kieper W.C., Jameson S.C., & Lefrancois L. 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1(5): 426–432.
- Sharma, P., Joyoti P., Preeti V., Priyanka S., & P.K. Goyal. 2009. Anti-tumor activity of *phyllanthus niruri* (a medicinal plant) on chemical-induced skin carcinogenesis in mice. *Asian Pasific J. Cancer Prev.* 10: 1089-1094.

- Singhal, M.K. 2004. Jungles: rich sources of medicinal plants. *Natural Product Radiance*. 3: 203.
- Skornickova, J.L., Otakar S., Mamyil S., & Karol M. 2008. Taxonomic and nomenclatural puzzles in Indian Curcuma: the identity and nomenclatural history of *C. zedoaria* (Christm.) Roscoe and *C. zerumbet* Roxb. (Zingiberaceae). 57 (3): 949-962.
- Sompayrac, L. 2003. How the immune system work. Blackwell Publishing, Massachussets.
- Starr, C. & Bavely M. 2007. **Human biology**. Brook/Cole Cengage Learning. Belmoth.
- Stendahl, M., A. Kronblad, L. Ryde, S. Emdin, N.O. Bengtsson, & G. Landberg. 2004. Cyclin D1 overexpression is a negative predictive factor for tamoxifen response in postmenopausa breast cancer patients. *Journal of Cancer*. 90:1942-1948.
- Stolarek, R.A., Potargowicz E., Seklewska E., Jakubik J., Lewandowski M., Jeziorski A & Nowak D. 2010.. Increased H₂O₂ level in exhaled breath condensate in primary breast cancer patients. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 136(6):923–930.
- Sun, L., Hao J. & Hui L. 2016. GARP: a surface molecule of regulatory T cell taht involved in the regulatory function and TGF- β releasing. *Oncotarget*. 7(27): 42826-42837.
- Syu, W.J., Shen, C.C., Don, M.J., Ou, J.C., Lee, G.H. dan Sun, C.M. 1998. Cytotoxicity of curcuminoids and some novel compounds from Curcuma doaria. *J. Nat. Prod*. 61: 1531-1534.
- Tachibana, Y., & K. Kawanishi. 1992. Mitogenic activities in protein fraction of crude drugs. *Planta Med*. 58: 250–254.
- Tan, J.T., Ernst B., Kieper W.C., LeRoy E., Sprent J., & Surh C.D. 2002. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8 β cells but are not required for memory phenotype CD4 cells. *J Exp Med* 195(12): 1523–1532.
- Tang, Y.Q., Indubala, J., Risy M., & Shamala D.S. 2013. Phyllanthus Suppresses Prostate Cancer Cell, PC-3, Proliferation and Induces Apoptosis through Multiple Signalling Pathways (MAPKs, PI3K/Akt, NF κ B, and Hypoxia). *Evidence-Based Complementaru and Alternative Medicine*. 6 (9): 581-594.
- Teicher, B.A. 2007. Transforming growth factor- β and the immune response to malignant disease. *Clinical Cancer Research*.13(21): 6247–6251.

- Thacker, P.C. & Karunakaran D., 2015. Curcumin dan modin down-regulate TGF- β signaling pathway in human cervical cancer cells. *PLoS One*. 10(3):e0120045.
- Thomas, D.A., & Massague J. 2005. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*. 8(5):369–380.
- Tjandrawinata, R.R., Liana W.S & Dwi N. 2017. The use of *Phyllanthus niruri* L. as an immunomodulator for the treatment of infectious diseases in clinical settings. *Asian Pac. J. Trop. Dis*. 7(3): 132-140.
- Tripathi, M., Robert, C., Bernard K., & Jean-Francois, R. 2003. Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: A review of rationale and clinical evidence. *Clinical cancer Research*. 9: 4653-4665.
- Tsang, R.Y., A.Faye T., & Jane A.H. 2009. Cisplatin overdose: toxicities and management. *Drug Saf*. 32(12): 1109-1122.
- Tsuhima, H., Ito N., Tamura S., Matsuda Y., Inada M., Yabuuchi I., Imai Y., Nagashima R., Misawa H., Takeda H., Matsuzawa Y., & Kawata S. 2001. Circulating transforming growth factor beta 1 as a predictor of liver metastasis after resection in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res*. 7(5)1258-1262.
- Vang, K.B., Yang J., Pagan A.J., Li L., Wang J., & Grenn J.M.. 2010. Cutting edge; CD28 and cRel-dependent pathways initiate regulatory T cell development. *J. immunol*. 184(8) 4074-4077.
- Viglietta, V., Clare B.A., Howard L.W. & David A.H. 2004. Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell in patients with multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine*. 199(7): 971-979.
- Visvader, J.E. 2009. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev*. 23:2563-2577.
- Wan Jun, C. 2011. Tregs in immunotherapy: opportunities and challenges. *Immunotherapy*. 3(8): 991-914.
- Wijayakusuma, H. 2008. **Atasi kanker dengan tanaman obat**. Puspa Swara. Jakarta.
- Withley, A.C., Stoner G.D., Darby M.V., & Walle T. 2003. Intestinal epithelial cell accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic acid-extensive binding to protein ad DNA. *Biochem. Pharmacol*. 66: 907-915.
- World Health Organization (WHO). 2017. Cancer; Fact Sheet. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Terakhir di akses pada 1 Januari 2018.

- Wu, X., Peng M., Huang B., Zhang H., Huang B., Xue Z., Zhang L., Da, Y., Yang D., Yao Z., Zhang R., 2013. Immuno microenviroment profiles of tumor immune equilibriumand immune escape states of mouse carcinoma. *Cancer Letters*. 340(1): 124-133.
- Xia, Y., Shen S., & Inder M.V. 2014. NF-Kb, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res*. 2(9): 823:830.
- Zhao, L., Zhang, S.L., Tao, J.Y., Pang R., Jin F., Gou Y.J. Dong J.H., Ye P., Zhao H.Y. & Zheng G.H. 2008. Peliminary exploration on anti-inflammatory mechanism of Corilagin (beta-1-0-gallyol-3,6-(R)-hexahydroxydiphenoyl-D-glucose) in vitro. *J. Int. Imp*. 8: 1059-1064.
- Zhao, G., Zhong L., Tang L., Wu Z.S., Wang D.W., Zheng J., & Qiu Q.M. 2012. Curcumin inhibits suppressive capacity of natural occuring CD4 (+)CD25(+) regulatory T cells in mice in vitro. *International immunopharmacology*. 14): 99-106.
- Zitvogel, L., Kepp O., Senovilla L., Menger L., Chaput N., & Kroemer G. 2010. Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway. *Clin Cancer Res*. 16(12): 3100–3104.
- Zu X, Zhang Q, & Cao R. 2012. Transforming growth factor-beta signaling in tumor initiation, progression and therapy in breast cancer: an update. *Cell Tissue Res*.347(1):73–84.