

**PENGARUH EKSTRAK DAUN KENIKIR (*Cosmos caudatus*)
TERHADAP JUMLAH SEL T CD4⁺IFN-⁺ DAN CD8⁺IFN-⁺ PADA
MENCIT (*Mus musculus*) MODEL KANKER PAYUDARA**

SKRIPSI

oleh
AGUSTINA DWI UTARI
155090101111038



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

**PENGARUH EKSTRAK DAUN KENIKIR (*Cosmos caudatus*)
TERHADAP JUMLAH SEL T CD4⁺IFN-⁺ DAN CD8⁺IFN-⁺ PADA
MENCIT (*Mus musculus*) MODEL KANKER PAYUDARA**

SKRIPSI

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi**

oleh
Agustina Dwi Utari
155090101111038



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH EKSTRAK DAUN KENIKIR (*Cosmos caudatus*)
TERHADAP JUMLAH SEL T CD4⁺IFN-⁺ DAN CD8⁺IFN-⁺
PADA MENCIT (*Mus musculus*) MODEL KANKER PAYUDARA**

**AGUSTINA DWI UTARI
155090101111038**

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal
15 November 2019 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk
memperoleh gelar Sarjana Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui
Pembimbing

Drs. Aris Soewondo, M.Si
NIP. 196411221990021001

Mengetahui
Ketua Program Studi S1 Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dian Siswanto, S.Si., M.Sc., M. Si., Ph.D.
NIP. 197703202005011002

HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Agustina Dwi Utari
NIM : 155090101111038
Jurusan : Biologi
Penulis Skripsi Berjudul : Pengaruh Ekstrak Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*) Terhadap Jumlah Sel T CD4⁺IFN-⁻ dan CD8⁺IFN-⁻ 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, 28 November 2019

Yang menyatakan

Agustina Dwi Utari
155090101111038

Pengaruh Ekstrak Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*) Terhadap Jumlah Sel T CD4⁺IFN-⁻ dan CD8⁺IFN-⁻ pada Mencit (*Mus musculus*) Model Kanker Payudara

Agustina Dwi Utari, Aris Soewondo

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

2019

ABSTRAK

Kanker payudara sering terjadi pada wanita, meskipun pria juga dapat menderita kanker payudara, tetapi kasusnya terbilang sangat jarang. Kemoterapi merupakan salah satu pengobatan yang sering digunakan dalam proses penyembuhan kanker, namun kemoterapi memiliki efek samping bagi penderitanya. Oleh karena itu, diperlukan adanya studi mengenai tanaman herba yang mampu digunakan sebagai alternative untuk pengobatan kanker, salah satunya adalah tanaman kenikir. Tanaman kenikir memiliki senyawa flavonid yang dapat membantu proses penghambatan perkembangan sel kanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak kenikir (*Cosmos caudatus*) terhadap profil sel T CD4⁺, CD8⁺ dan ekspresi IFN-⁻ pada mencit model kanker payudara. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2018 – Juni 2019. Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu persiapan hewan coba, induksi senyawa DMBA pada mencit selama 6 minggu secara subkutan, pemberian ekstrak kenikir dengan 3 dosis berbeda selama 14 hari, isolasi organ spleen, pewarnaan antibodi sel, lalu dianalisis menggunakan *flowcytometer*. Analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS, uji ANOVA satu arah, uji Duncan. Pemberian ekstrak kenikir mampu menurunkan ekspresi sitokin proinflamasi IFN-⁻. Berdasarkan hasil yang didapatkan, dosis 2 lebih efektif dalam penurunan jumlah sel T CD4⁺IFN-⁻ pada kanker payudara sedangkan pada D1 lebih efektif dalam penurunan jumlah sel T CD8⁺IFN-⁻ pada kanker payudara meskipun keduanya tidak berbeda nyata.

Kata Kunci : Kanker Payudara, Kenikir, CD4⁺, CD8⁺, IFN-⁻

Influence of Extract Leaf Kenikir (*Cosmos caudatus*) to Amount Cell T CD4⁺IFN-⁺ dan CD8⁺IFN-⁺ in Mice (*Mus musculus*) of Breast Cancer Model

Agustina Dwi Utari, Aris Soewondo

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

2019

ABSTRACT

Breast cancer often occurs in women, while men can also suffer from cancer, but the cases are fairly rare. Chemotherapy is one treatment that is often used in the process of healing cancer, but chemotherapy has side effects for sufferers. Therefore, it is necessary to have a studio about herbal plants that can be used as an alternative for cancer treatment, one of them is kenikir plants. Kenikir plants have a flavonid composition that can help the process of inhibiting the development of cancer cells. This study discusses extracts of kenikir (*Cosmos caudatus*) on CD4⁺, CD8⁺ T cell profile and IFN- γ expression in mice of breast cancer models. This research was conducted in October 2018 - June 2019. Prepare mice, induction of DMBA composition in mice for 6 weeks a subcutaneous, administration of kenikir extract with 3 doses added for 14 days, spleen organs, staining of cell antibodies. Then analyzed using a *flowcytometer*. Analysis data was performed using SPSS, one-way ANOVA and Duncan test. Provision of kenikir extract can reduce IFN- γ proinflammatory cytokine levels. Based on the results obtained, dose 2 is more effective in decreasing the number of CD4⁺IFN- γ T cells in breast cancer on D1 is more effective in decreasing the number of CD8⁺IFN- γ T cells in breast cancer that is not significantly different.

Keywords: Breast Cancer, *Cosmos caudatus*, CD4⁺, CD8⁺, IFN- γ

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Robbil 'Aalamiin, dengan ungkapan rasa syukur pada Allah Yang Maha Kuasa akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan 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. Ibu Dr. Sri Rahayu, M.Kes selaku Dosen Penguji I yang telah memberi pengarahan serta tambahan ilmu dan saran-saran yang berguna bagi penulis.
3. Bapak Dr. Drs. Agung Pramana Warih Marhendra, M.Si selaku Dosen Penguji II yang telah memberi saran yang bermanfaat demi perbaikan penyusunan skripsi.
4. Orang tua atas segala doa, dukungan, dan motivasi yang tidak terkira.
5. Rekan-rekan Biologi Angkatan 2015 “Limfosit” dan seluruh civitas akademik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Teman-teman diluar jurusan yang selalu memberi support selama pengerjaan naskah skripsi ini (Ambar, Dina, Asma, Winda, Fani, Levita, Luthfi, Widya, Jak Ngalam, Forsimaja dan teman-teman lain yang tidak bisa disebutkan satu per satu)

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

Malang, 28 November 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR SINGKATAN	viii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Manfaat Penelitian.....	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
1.1 Kanker Payudara	3
2.2 DMBA	3
2.3 Tumbuhan Kenikir	8
2.3.1 Klasifikasi Tumbuhan Kenikir	8
2.3.2 Morfologi Tumbuhan Kenikir	9
2.3.3 Flavonoid	10
2.4 Apoptosis	14
2.5 Respon Imun Terhadap Kanker	16
2.6 Sel T CD4 ⁺	17
2.7 Sel T CD8 ⁺	18
2.8 Interferon Gamma	20
BAB III METODE	
3.1 Waktu dan Tempat	22
3.2 Persiapan Hewan Coba	22
3.3 Desain Eksperimen.....	22
3.4 Induksi DMBA	23

3.5 Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Kenikir ...	24
3.6 Dislokasi dan Pembedahan Mencit	25
3.7 Isolasi Organ Spleen	25
3.8 Pewarnaan Antibodi Sel	26
3.9 Analisis Data	26

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Histologi Kanker Payudara	27
4.2 Hasil Profil CD4 ⁺ IFN-	27
4.3 Hasil Profil CD8 ⁺ IFN-	30

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan	33
5.2 Saran	33

DAFTAR PUSTAKA

34

LAMPIRAN

40

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1	Kelompok Perlakuan Mencit Betina 23

DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1	Struktur DMBA	5
2	Aktivasi metabolik DMBA	6
3	Tahapan Karsinogenesis	7
4	Tanaman Kenikir	9
5	Struktur Dasar Flavonoid	10
6	Struktur dari 6 subkelas flavonoid.....	11
7	Mekanisme Apoptosis	15
8	Histologi Jaringan Payudara	27
9	Hasil jumlah relatif sel CD4 ⁺ IFN-	28
10	Hasil jumlah relatif sel CD8 ⁺ IFN-	31

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	Uji ANOVA Sel T CD8 ⁺ IFN- _γ	40
2	Uji ANOVA Sel T CD4 ⁺ IFN- _γ	42
3	Galting Sel T CD8 ⁺ dan CD4 ⁺	45
4	DMBA	46
5	Mekanisme <i>freeze dry</i>	47

DAFTAR SINGKATAN

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
AHR	Arylhydrocarbon
APC	Antigen Presenting Cell
BB	Berat Badan
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-XL	B-cel lymphoma-extra large
BCR	B-cell Receptor
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Complement Dependent Cytotoxicity
CDKs	Cyclin Dependent Kinase
CKIs	Cyclin Dependent Kinase Inhibitors
CTLA	Cytotoxic T-lymphocyte Associated Protein
CTLs	Cytotoxic Lymphocytes
CYP1A1	Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 1
CYP1B1	Cytochrome P450 Family 1 Subfamily B Member 1
D1	Dosis 1
D2	Dosis 2
D3	Dosis 3
DMBA	7,12-dimetilbenz () antrasen
DNA	Deoxyribonucleic acid
DR	Death Receptor
ER	Esterogen Receptor
FADD	Fas-Associative Death Domain
FasL	Fas Ligand

HLA
IDC

IFN
IL
mEH

mg
MHC

NK
PAH

PCD
PG

PMN

RAL

RNA

ROS

STAT

TAA

Tc

TCR

Th

TIL

TNF

TRAIL

Human Leucocyte Antigen
Invasif atau Infiltrating

Duktal Carcinoma

Interferon

Interleukin

Microsomal epoxide
hydrolase

Miligram

Major Histocompatibility
Complex

Natural Killer

Polycyclic Aromatic

Hydrocarbon

Programmed Cell Death

Prostaglandin

Polimorfonuklear

Rancangan Acak Lengkap

Ribonucleic acid

Reactive Oxygen Species

Signal Transducer and
Activator of Transcription

Tumor Associated Antigen

T cytotoxic

T Cell Receptor

T helper

Tumor Infiltrating

Lymphocytes

Tumor Necrosis Factor

Tumor Necrosis Factor-
Related Apoptosis Inducing

Ligand

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan hasil dari proses perkembangan yang berbentuk penyimpangan proses kehidupan sel atau dapat dikatakan telah mengalami transformasi sel (Subowo, 2013). Kanker adalah salah satu jenis penyakit tidak menular yang angka kejadiannya memiliki kecenderungan meningkat pada setiap tahunnya. Data WHO pada tahun 2010 menyebutkan bahwa kanker menempati urutan nomor dua sebagai penyebab kematian terbanyak, berada di bawah penyakit kardiovaskuler. Kanker payudara menempati urutan pertama sebagai jenis kanker yang paling umum diderita oleh perempuan di dunia. Kanker payudara memiliki kontribusi sebesar 25% dari total kasus baru kanker secara keseluruhan yang terdiagnosis pada tahun 2012 (Priyatin dkk., 2013). Kanker payudara sering terjadi pada wanita, meskipun pria juga dapat menderita kanker payudara, tetapi kasusnya terhitung sangat jarang. Frekuensi kanker payudara relatif tinggi. Kanker ini lebih sering terjadi pada wanita berusia 40 tahun ke atas, lebih banyak menyerang payudara yang sebelah kiri dan lebih sering menyerang pada bagian atas payudara (dekat lengan) (Wijayakusuma, 2008).

Metode terapi kanker yang saat ini umum digunakan adalah dengan radiasi, kemoterapi, dan operasi. Berdasarkan metode-metode yang digunakan tersebut, belum ada metode terapi yang memberikan efikasi dan keamanan yang memuaskan. Salah satu contoh adalah adanya efek samping penggunaan kemoterapi yang memberikan rasa nyaman pada penderita, seperti kerontokan rambut, mual, muntah, dan rasa nyeri yang amat sangat (Adnyana dkk., 2011)

Beberapa obat antikanker yang dikembangkan saat ini antara lain obat yang dapat merangsang diferensiasi sel sehingga akan terjadi perubahan sifat dari sel kanker yang ganas menjadi sel jinak, obat yang dapat meningkatkan efektivitas radiasi, dan obat yang mampu merubah respon imun sel kanker dengan sel sehat. Penggunaannya sebagai obat antikanker, obat-obatan kimia seperti kemoterapi tidak hanya membunuh sel tumor namun juga merusak sel darah, sehingga dapat menyebabkan penurunan fungsi imun atau bahkan kematian

yang disebabkan dari komplikasi akibat efek samping obat yang serius. Permasalahan yang kerap dialami dalam penggunaan obat kimia antara lain terjadinya berbagai efek samping serta dapat menyebabkan munculnya resistensi, toleransi, dan selektivitas obat itu sendiri (Li dkk., 2008).

Salah satu cara alternatif dalam pengobatan kanker adalah dengan menggunakan tanaman, yaitu tanaman kenikir. Tanaman kenikir (*Cosmos caudatus*) merupakan salah satu tanaman yang memiliki aktivitas antikanker. Tanaman ini memiliki rasa manis dan bersifat dingin. Beberapa bahan kimia yang terkandung dalam kenikir antara lain senyawa saponin, flavonoid, polifenol dan minyak atsiri. Tanaman ini biasanya digunakan untuk penambah nafsu makan, penguat jantung, dan dapat juga sebagai pengusir serangga (Hariana, 2008). Senyawa flavonoid diketahui mampu menginduksi terjadinya apoptosis. Apoptosis adalah kematian sel terprogram dan berperan penting dalam proses perkembangan kanker (Ren dkk., 2003). Berdasarkan hal tersebut, maka tanaman kenikir ini diharapkan dapat memacu terjadinya proses apoptosis sel pada kanker payudara.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang terdapat pada penelitian ini adalah bagaimana pengaruh ekstrak kenikir (*Cosmos caudatus*) terhadap jumlah sel T CD4⁺IFN-⁻ dan CD8⁺IFN-⁻ pada mencit betina model kanker payudara?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan diadakannya penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh ekstrak kenikir (*Cosmos caudatus*) terhadap jumlah sel T CD4⁺IFN-⁻ dan CD8⁺IFN-⁻ pada mencit betina model kanker payudara

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan pengetahuan bahwa obat herbal dapat juga digunakan untuk proses penyembuhan kanker serta memberikan informasi tanaman yang jarang digunakan ternyata memiliki manfaat untuk menyembuhkan penyakit kronis seperti kanker

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

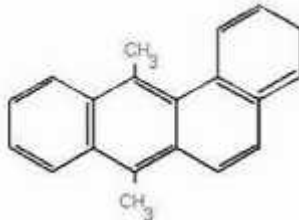
2.1 Kanker Payudara

Tumor digolongkan menjadi dua jenis berdasarkan tingkat keganasan. Tumor yang tidak menyebar ke jaringan didekatnya, tidak bermetastasis menjadi lebih besar dan dapat dihilangkan dengan pembedahan minor dinamakan tumor jinak. Sementara tumor yang dinyatakan ganas (disebut kanker), merupakan tumor yang memiliki kemampuan menyebar ke jaringan lain, bermetastasis dan dapat menyebabkan kematian pada penderita (Aryani, 2003). Kanker merupakan hasil dari proses perkembangan yang berbentuk penyimpangan proses kehidupan sel atau dapat dikatakan telah mengalami transformasi sel. Sel yang mengalami penyimpangan tersebut tidak menghadapi hambatan dalam proses pembelahannya, bahkan proses pembelahannya melampaui kewajarannya. Dengan demikian, kanker disebabkan oleh tidak terkendalinya siklus pembelahan sel. Sel-sel yang mengalami transformasi ganas luput dari pengendalian pertumbuhan normal yang selanjutnya menyusup ke jaringan sekitarnya yang masih normal dan akhirnya dapat bermigrasi ke tempat-tempat lain di tubuh untuk berkembang menjadi jaringan tumor sekunder. Transformasi tersebut merupakan proses bertahap yang melibatkan kombinasi kerusakan gen yang termasuk kedalam kelompok gen yang berfungsi mengendalikan siklus pembelahan, akhir siklus dan apoptosis. Kerusakan gen yang berbentuk mutasi tersebut bekerja bersama sehingga menyebabkan terjadinya transformasi sel (Subowo, 2013). Kanker yang berasal dari jaringan epitel tergolong karsinoma, sementara kanker yang berasal dari jaringan mesenkim disebut sarkoma (Alison, 2003). Kanker dapat dipicu oleh berbagai hal antara lain oleh bahan kimia seperti senyawa *7,12-dimetilbenz () antrasen* (DMBA) yaitu zat kimia yang termasuk dalam *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH) yang dikenal bersifat mutagenik, teratogenik, karsinogenik, sitotoksik, dan immunosupresif (Lee dkk., 2002).

2.2 DMBA (*7,12 dimethylbenzen(a)-anthracene*)

Karsinogen adalah bahan yang dapat memicu terjadinya kanker. Karsinogen dapat mempengaruhi DNA atau suatu protein yang

berperan pada pengaturan siklus pembelahan sel, seperti *protooncogene* atau *tumor suppressor gene*. Terjadinya penyakit ganas yang disebabkan oleh mutasi DNA dikelompokkan dalam 2 fase, yaitu *initiation phase* dan *promotion phase*. Hal ini dapat dijelaskan apabila bahan yang bersifat karsinogenik masuk kedalam tubuh, maka didalam tubuh bahan ini langsung mengalami proses detoksifikasi untuk kemudian di ekskresi. Selain itu, bahan karsinogenik tersebut terlebih dahulu di metabolisme di dalam tubuh. Kemudian hasil metabolisemenya didetoksifikasi dan berikutnya diekskresi. Apabila proses ini tidak dapat dilakukan oleh tubuh, maka hasil metabolit dari bahan karsinogenik ini akan berikatan dengan rantai DNA, sehingga DNA menjadi cacat (*defect*). Sebagai akibat dari adanya kecacatan DNA, tubuh berusaha untuk melakukan perbaikan DNA yang dikenal dengan DNA *repair*. Bila perbaikan DNA ini tidak berhasil, sel yang memiliki DNA abnormal tersebut akan di eksekusi dan dimusnahkan. Apabila proses eksekusi ini tidak mampu dilakukan oleh tubuh, maka sel tersebut memiliki DNA cacat yang bersifat permanen. Kondisi ini dikenal dengan *initiation phase*. Selanjutnya sel yang memiliki DNA cacat tersebut akan mengalami proliferasi dan diferensiasi, serta berkembang menjadi *malignant* (ganas), kondisi ini dikenal dengan *promotion phase* (Sudiana, 2008). Zat karsinogenik yang digunakan untuk induksi karsinogenesis kelenjar susu pada hewan adalah *7,12-dimethylbenz-[a]anthracene* (DMBA). DMBA adalah kelas senyawa hidrokarbon *polyaromatik* (PAH) yang merupakan karsinogen. Senyawa DMBA adalah pro-karsinogen yang akan menjadi metabolit aktif setelah dimetabolisme oleh sitokrom P-450 dan mengikat DNA secara kovalen sehingga dapat memicu pembentukan tumor ganas (*maligna*) (Lenoir dkk., 2005). Dosis tunggal yang besar dan dosis ganda dapat menimbulkan kanker kulit, payudara, limfoma, hati, kolon, dan leukemia tanpa memperhatikan rute administrasinya (Qing, dkk., 1997).



(Sigma, 2007)

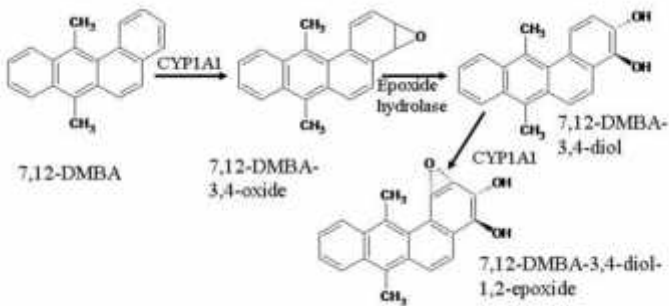
Gambar 1. Struktur DMBA

DMBA dipilih sebagai bahan karsinogen karena reseptor dari senyawa ini adalah *arylhydrocarbon* (AhR) yang sebagian besar terkandung dalam kelenjar reproduksi, khususnya kelenjar susu. AhR adalah faktor transkripsi yang diaktifkan oleh senyawa respons ligan dari alam. AhR banyak diekspresikan dalam saluran reproduksi pada berbagai spesies dan beberapa indikasi menunjukkan bahwa AhR memainkan peran penting dalam fisiologi reproduksi (Pocar dkk., 2005)

Microsomal Epoxide Hydrolase (mEH) adalah suatu enzim yang mengkatalisis hidrolisis dari epoksida alifatik, dan reaksi-reaksi ini umumnya dianggap sebagai jalur detoksikasi. Hidrolisis turunan epoksida dari DMBA dan benzo [a] piren, diperlukan untuk jalur metabolisme utama untuk mengaktifkan karsinogen ke turunan elektrofilik utama. Pada saat aktivasi metabolik DMBA, mEH adalah satu-satunya enzim yang mengubah DMBA-3,4-epoksida menjadi DMBA-3,4-dihydrodiol (DMBA3,4-diol), dan kemudian CYP1A1 atau CYP1B1 mengoksidasi DMBA3,4-diol menjadi bentuk karsinogenik akhir, DMBA-3,4-diol-1,2-epoxide (Miyata dkk., 2001).

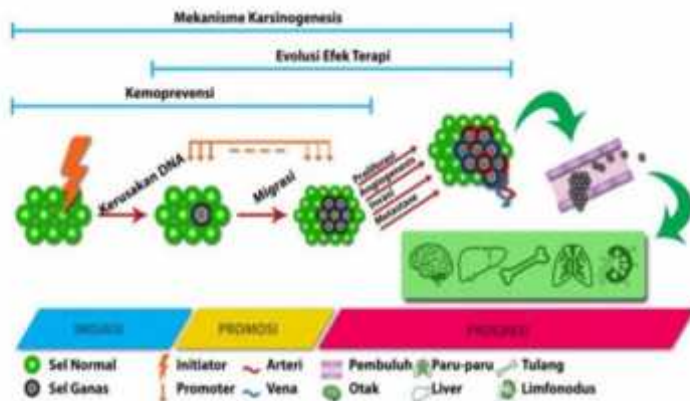
Interaksi antara DNA dengan senyawa hidrokarbon karsinogenik yang dikatalisis oleh sistem enzim, yaitu enzim mikrosom dan enzim-hidroksilasi dalam hati yang akan mengubah senyawa benzo [a] piren menjadi perantara aktif yang dapat mengikat kovalen dengan DNA (Wibowo dkk., 2010). Induksi ekspresi CYP1A1 dimediasi melalui reseptor spesifik sitosol, yaitu *reseptor aril hidrokarbon* (AHR). Reseptor ini adalah bagian dari protein yang dapat mengikat sitosol dari kontaminan lingkungan seperti senyawa

hidrokarbon aromatik polisiklik (PAH) dan senyawa turunan halogen (Gambar 2) (Androutsopoulos dkk., 2009).



Gambar 2. Aktivasi metabolik DMBA menjadi metabolit karsinogenik dari 7,12-DMBA-3, 4-diol dan menjadi 7,12-DMBA-3, 4-diol-1, 2 epoksida oleh enzim CYP1A1 dan epoksida hidrolase (Androutsopoulos dkk., 2009).

Bahan karsinogen kimia pada umumnya memerlukan paparan berulang kali sebelum ia mengakibatkan transformasi sel dan kanker. Periode antara kontak pertama dengan karsinogen dan timbulnya kanker disebut periode laten, yang lamanya bergantung pada dosis karsinogen (*dose dependent*). Periode antara kontak dengan karsinogen dan timbulnya kanker dibagi dalam beberapa fase. Fase pertama dimulai pada saat kontak pertama dengan karsinogen dan disebut fase inisiasi, biasanya berlangsung cepat dan karsinogen menyebabkan lesi DNA permanen. Fase ke-2 yang disebut fase promosi terjadi proses dimana sel-sel yang mengalami inisiasi berubah menjadi sel-sel preneoplastik. Fase promosi yang berlangsung lama (periode laten) terjadi berbagai perubahan pada sel atau jaringan misalnya perubahan sintesis fosfolipid, perubahan sintesis DNA dan RNA, pelepasan prostaglandin, perubahan morfologi dan lain-lain. Fase ke-3 adalah fase progresi dimana terjadi evolusi sel pre-neoplastik menjadi sel neoplastik. Berikut adalah tahap-tahap karsinogenesis (Gambar 3) (Kurniasari dkk., 2017).



Gambar 3. Tahapan Karsinogenesis

Tahap inisiasi menggambarkan perubahan genetik sel somatik normal tunggal melalui mutasi dan masuk kedalam mekanisme perkembangan sel yang abnormal dan berpotensi neoplastik. Tahapan ini terjadi dalam waktu singkat. Mutasi gen merupakan penyebab sel terinisiasi selain itu, kerusakan yang lebih besar pada kromosom seperti delesi, duplikasi, translokasi, atau aneuploidi juga menyebabkan sel terinisiasi. Kerusakan DNA tersebut mengakibatkan perubahan di dalam genom sel yang bersifat permanen dan berakhir pada mutagenesis. Sel yang telah mengalami kerusakan DNA tersebut akan tumbuh lebih cepat dibandingkan dengan sel normal. Mutasi gen tersebut akan mengaktifkan maupun menghambat *proto-onkogen* yang mengubah fungsi *proto-onkogen* dan *tumor suppressor gene* antara lain adalah karsinogen yang mengubah struktur DNA. Tahap ini berlangsung beberapa hari dan dipicu oleh spesies kimia reaktif, radikal bebas dan virus (Kurniasari dkk., 2017).

Tahap promosi adalah perkembangan awal sel yang terinisiasi membentuk klon melalui pembelahan dan berinteraksi melalui komunikasi sel ke sel dan stimulasi mitogenik, faktor diferensiasi sel dan proses mutasi maupun non mutasi epigenetik yang semuanya mungkin berperan dalam tahap awal pertumbuhan preneoplastik. Pada tahap ini, sel mengalami perubahan tambahan dalam genom yang berpotensi mengakselerasi ketidakstabilan genom sel. Tahap ini

mempunyai waktu beberapa tahun, bahkan bisa lebih dari sepuluh tahun, dengan melalui mekanisme epigenetik dimana akan terjadi ekspansi sel-sel rusak membentuk premalignansi dari populasi multiseluler tumor yang melakukan proliferasi. Senyawa-senyawa yang merangsang pembelahan sel disebut promotor atau epigenetik karsinogen (Kurniasari dkk., 2017).

Tahap progresi adalah tahap karsinogenesis yang paling dekat dengan data klinis. Tahap ini menggambarkan perubahan genomik yang cepat, dimana populasi klonal sel yang berevolusi akan mengarah pada perkembangan keganasan jika tidak dihambat oleh lingkungan mikro dalam sel. Progresi keganasan sebagai fae karsinogenik dengan perbanyakan sel yang mengalami transformasi yang relatif tertunda sampai mengalami peningkatan keganasan dan mampu untuk berpindah ke jaringan normal disekitarnya dan yang lebih jauh adalah metastasis (Kurniasari dkk., 2017).

Mekanisme karsinogenesis baik biokimia maupun molekuler berbeda antara satu karsinogen dengan yang lain, bergantung pada struktur dan sumber karsinogen masing-masing, tetapi pada dasarnya sasaran karsinogen adalah menimbulkan lesi pada untaian DNA yang mengandung berbagai jenis gen. Sasaran utama lesi genetik adalah DNA, dan jika yang terkena lesi adalah gen yang mengatur siklus dan pertumbuhan sel maka akan terjadi disfungsi gen-gen bersangkutan sehingga terjadi tranformasi. P53 adalah salah satu jenis gen yang sering mengalami mutasi tersebut (Kurniasari dkk., 2017).

2.3 Tumbuhan Kenikir (*Cosmos caudatus*)

2.3.1 Klasifikasi Tumbuhan Kenikir

Berdasarkan taksonominya, tumbuhan kenikir diklasifikasikan sebagai berikut (Simpson, 2006):

- Kerajaan : Plantae
- Divisi : Magnoliophyta
- Kelas : Magnoliopsida
- Bangsa : Fabales
- Suku : Asteraceae
- Marga : *Cosmos*
- Jenis : *Cosmos caudatus*

2.3.2 Morfologi Tumbuhan Kenikir

Kenikir merupakan tanaman herba (tanaman dengan batang yang lunak) semusim dengan ketinggian dapat mencapai 1,5 m. Batangnya segi empat dengan alur membujur dan mempunyai banyak percabangan. Daunnya adalah daun majemuk yang berbagi menyirip dengan tiap-tiap anak daun berbentuk lanset dengan tepian bergerigi. Bunganya juga merupakan bunga majemuk, berbentuk cawan, mahkota berwarna jingga dengan daun pembalut di bagian dasar bunga yang berbentuk seperti lonceng. Bijinya berwarna hitam dan juga berbentuk seperti jarum (Hidayat dkk., 2008) (Gambar 4).



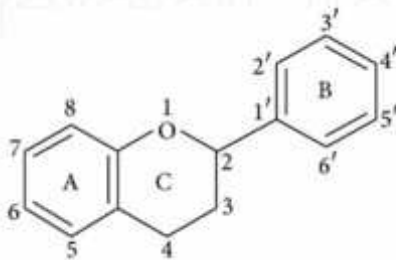
(Hidayat,2008)

Gambar 4. Tanaman Kenikir

Daun kenikir mengandung senyawa aktif seperti flavonoid, flavon dan flavanon, polifenol, saponin, tanin, alkaloid dan minyak astiri. Kandungan flavonoid yang terdapat dalam daun kenikir seperti myricetin, kuersetin, kaempferol, luteolin dan apigenin. Kuersetin dan kaempferol yang tertinggi juga terdapat dalam daun kenikir berkisar 0,3-143 mg/100g berat basah dan total fenol terbesar yaitu 1,52 mg GAE/100 g berat basah daun kenikir. Oleh karena itu, daun kenikir diidentifikasi sebagai sumber sayuran yang memiliki potensi kaya flavonoid dan antioksidan (Andarwulan dkk., 2010). Menurut Lotulung dkk., (2001) daun kenikir mengandung senyawa yang memiliki daya antioksidan yang cukup tinggi, dengan harga IC_{50} sebesar 70 mg/L.

2.3.3 Flavonoid

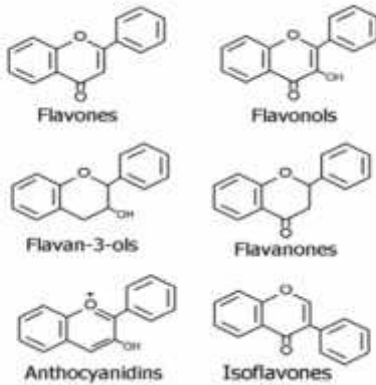
Flavonoid adalah metabolit sekunder dari polifenol yang ditemukan secara luas pada tanaman serta makanan dan memiliki berbagai efek bioaktif termasuk anti virus, anti-inflamasi (Qinghu dkk., 2016), kardioprotektif, antidiabetes, anti kanker, (Marzouk, 2016) anti penuaan, antioksidan. Flavonoid termasuk dalam famili polifenol yang larut dalam air (Vanessa dkk., 2014). Flavonoid adalah senyawa polifenol yang mempunyai 15 atom karbon yang tersusun dalam konfigurasi C6-C3-C6, artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C6 (cincin benzena tersubstitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon (Tian dkk., 2018) (Gambar 5).



(Yerlikaya, 2017)

Gambar 5. Struktur dasar Flavonoid

Flavonoid memiliki enam subkelas utama berdasarkan jangkauan dan kompleksitas strukturalnya, yaitu flavonol, flavon, flavan-3-ols, flavanon, anthocyanin dan isoflavon (Hooper dkk., 2008).



(Hooper dkk., 2008)

Gambar 6. Struktur dari 6 subkelas flavonoid

Flavonoid utama yang termasuk dalam subkelas ini adalah kuercetin, myricetin, dan kaempferol untuk flavonol, Hesperitin dan narigerin untuk flavanon. Epicatechin dan catechin untuk flavan-3-ols. Apigenin dan luteolin untuk flavon. Cyanidin, antineamid dan malidin maline genistein dan daizeina untuk isoflavan (Arts & Hollman, 2005).

Flavon dan flavonol memiliki jumlah senyawa terbesar yang mewakili sebagian kecil flavonoid, yaitu kategori 2-benzo-pyron. Flavanon dan flavanonol memiliki ikatan jenuh C dan sering ditemukan dengan flavon dan flavonol pada tanaman. Isoflavan, seperti daidzein, adalah senyawa 3-fenil-kromon. Sebagai prekursor utama biosintesis flavonoid, kalcon adalah isomer pembuka cincin C dari dihydroflavan, bertanggung jawab untuk tampilan warna tanaman. Flavanol adalah produk reduksi dari dihydroflavanols, terutama dengan flavan-3-ol yang terdistribusi pada kerajaan tumbuhan, juga dikenal sebagai katekin. Namun, masih ada flavonoid lain tanpa kerangka C₆-C₃-C₆, misalnya biflavan, kromon, furan dan xanthon. Glikosida, dengan kategori penghubung yang berbeda, yang mendominasi bentuk flavonoid yang ada. Pilihan sisi glikosilasi dikaitkan dengan struktur aglycones C₂ = C₃ (Tian Yang dkk., 2018). Flavonol umumnya terdapat dalam bentuk glikosida dalam bentuk umum seperti kaempferol, kuercetin dan mirisetin. Perbedaan antara flavon dan flavonol adalah pada flavon

tidak ditemukannya gugus hidroksil pada atom C-3. Flavon yang sering dijumpai adalah apigenin dan luteolin. Flavonoid ini secara signifikan banyak ditemukan pada beberapa bagian tanaman seperti buah dan sayuran yang berperan sebagai neurotrophin dalam mamalia, mengurangi angiogenesis dan zat antioksidan (Koirala dkk., 2014). Quercetin mewakili subklas flavonol yang menunjukkan nutrisi dan sifat farmasinya. Struktur cincin dan konfigurasi aglyconnya dari kelompok hidroksil, menjadikannya salah satu dari flavonoid yang paling ampuh dalam hal kemampuan antioksidan. Quercetin telah menunjukkan kemampuan untuk mencegah oksidasi *low-density lipoprotein* (LDL) dengan menangkalkan radikal bebas dan ionisasi sehingga quercetin membantu dalam pencegahan penyakit tertentu, seperti kanker, aterosklerosis, dan peradangan kronis, yang umumnya disebabkan oleh adanya ikatan rangkap pada flavon cincin aromatik pusat yang ditandai oleh struktur planar (Arifin, 2018). Sel-sel kanker payudara MCF-7 yang terkena peningkatan konsentrasi quercetin, akibatnya akan menurunkan rasio viabilitas sel dan di picunya apoptosis. Setelah paparan sel hingga dosis sitotoksik moderat quercetin selama 48 jam, sel menjalani apoptosis karena aktivasi caspases. Selain itu, quercetin memediasi gangguan rasio Bcl-2 / Bax dalam sel MCF-7 (Duo J, 2012).

Isoflavonoid adalah sub-grup flavonoid yang sangat khas. Mereka memiliki peran penting sebagai prekursor perkembangan phytoalexin selama interaksi mikro tanaman. Metabolisme dari isoflavonoid dimulai dengan karbon tertentu yang melalui jalur fenilpropanoid. Setelah beberapa proses enzimatik, senyawa fenolik, isoflavonoid dihasilkan. Salah satu contoh isoflavon adalah deidzein. Daidzein mencegah proliferasi sel kanker payudara T47D dan bertindak sebagai agen antiestrogenik (De Lemos, 2001). Konsentrasi daidzein mikrometer lima puluh menurunkan viabilitas sel dalam sel kanker payudara MDA-MB-231 dan MCF-7 masing-masing sebesar 50 dan 42%, selama 48 jam. Selain itu, daidzein menghambat migrasi sel dan invasi dalam sel kanker payudara (Medeiros, 2016).

Senyawa flavonoid diketahui mampu menginduksi terjadinya apoptosis. Apoptosis adalah kematian sel terprogram dan berperan penting dalam proses perkembangan kanker. Mekanisme flavonoid

dalam menginduksi apoptosis adalah melalui penghambatan aktivitas DNA topoisomerase I/II, modulasi *signalling pathways*, penurunan ekspresi gen Bcl-2 dan Bcl-XL, peningkatan ekspresi gen Bax dan Bak, serta aktivasi endonuklease (Ren dkk., 2003). Flavonoid juga dapat menginduksi apoptosis pada jalur independen ROS (*Reactive Oxygen Species*).

Topoisomerase merupakan suatu enzim yang berfungsi memotong DNA yang berilitan ketat akibat pembukaan double strand DNA oleh enzim helikase, memutar balik dan kemudian menyambungkan lagi. Enzim tersebut bekerja pada saat perpanjangan replikasi DNA (Sismindari, 2002). Jika terjadi penghambatan terhadap aktivitas topoisomerase, akan terjadi stabilisasi kompleks topoisomerase-DNA terpotong, sehingga menghasilkan kerusakan double strand DNA yang permanen (Beck dkk., 2001).

Bax, Bak, Bcl2 dan Bcl-xl adalah family protein Bcl-2. Bax dan Bak merupakan protein proapoptosis sedangkan Bcl-2 dan Bcl-xl merupakan protein antiapoptosis (King, 2000). Bcl2 menempel pada membran luar mitokondria sehingga menghalangi pelepasan sitokrom c sedangkan Bcl-xl berikatan dengan Apaf-1 (Nunez dkk., 1998). Sitokrom c dan Apaf-1 diperlukan dalam proses apoptosis melalui jalur intrinsik dengan cara mengaktifasi caspase 9 (Saleh dkk., 1999). Fungsi bertahan hidup tersebut diimbangi oleh fungsi kematian sel yang diperantarai oleh Bax dan Bak. Bax dapat berikatan dengan membran luar mitokondria sehingga menginduksi pengeluaran sitokrom c dari mitokondria sedangkan Bak dapat berikatan dengan Bcl-xl sehingga membebaskan Apaf-1 (Nunez dkk., 1998).

Secara umum, flavonoid telah terbukti menghambat produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) dalam makrofag, sehingga memediasi aktivitas modulasi imun makrofag. Flavon yang memiliki banyak gugus hidroksil, seperti apigenin dan luteolin dapat menginduksi apoptosis (Sudhakaran, 2019).

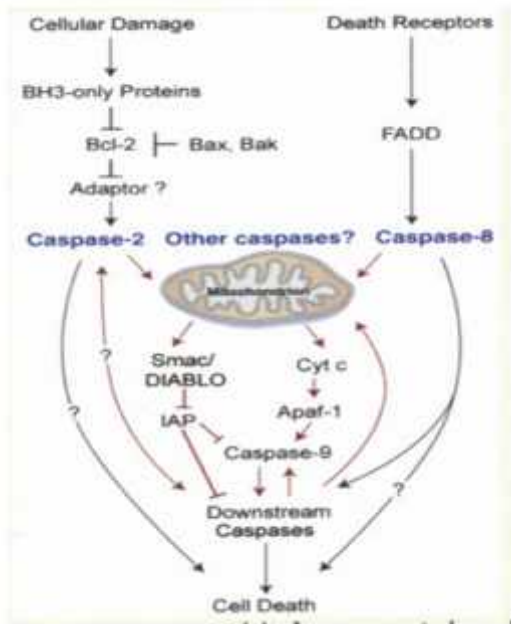
Studi terbaru memberikan bukti bahwa flavonoid juga dapat mengerahkan fungsinya dengan menargetkan protein secara langsung. Kemiripan struktural mereka dengan estrogen bertanggung jawab atas kemampuan isoflavon (mis., Genistein) dan flavanon

(mis., Naringenin) untuk mengikat Estrogen Receptor (ER). ER dan ER (Huang, 2010).

2.4 Apoptosis

Dalam menjalankan hidupnya, sel melakukan suatu aktivitas yang disebut siklus replikasi sel yang dibagi menjadi 4 fase yakni Gap-1 (fase antara mitosis dan sintesis DNA, G1), Sintesis (S), Gap-2 (fase antara sintesis dan mitosis, G2) dan Mitosis (M). Replikasi DNA berlangsung pada fase S dan pemisahan mitotik sister chromatid berlangsung pada fase M. Fase S dan M adalah fase yang paling mudah dipengaruhi oleh berbagai faktor. Oleh karena suatu faktor, misalnya pajanan radiasi, sel biasanya melakukan “*arrest*” pada fase G1 atau G2. Hanya setelah perbaikan DNA selesai, pembelahan sel akan memasuki fase berikutnya. Bila sel mengalami kerusakan yang besar, mereka akan mengaktifkan apoptosis yakni kematian sel terprogram melalui digesti enzimatik oleh dirinya sendiri. Apoptosis merupakan suatu mekanisme yang efisien untuk mengeliminasi sel yang tidak diperlukan dan mungkin berbahaya sehingga dapat menyelamatkan organisme (Nurhayati & Yanti, 2006)

Apoptosis adalah program bunuh diri intraseluler yang dilaksanakan dengan cara mengaktifkan caspase (suatu keluarga sistein protease). Dua jalur utama apoptotik adalah jalur intrinsik dan ekstrinsik. Jalur intrinsik meliputi pemberian kode yang memicu proses mitokondria-dependent pelepasan sitokrom c dan mengaktifkan caspase 9, dan jalur ekstrinsik meliputi pengaktifan reseptor kematian (*death receptor* (DR)) seperti Fas (reseptor *Tumor necrotic factor*), DR4 dan DR5. Interaksi dengan ligan yang sesuai akan mengarah ke transduksi sinyal yang diawali dengan peliputan molekul yang berhubungan dengan DR seperti *Fas-associated death domain* (FADD) dan berikutnya mengaktifkan caspase 8. Caspase ini kemudian mengkatalis sederet proses proteolitik yang menghasilkan perubahan biokimia dan morfologi khas yang berhubungan dengan proses apoptosis (New Mayer & Ferguson, 2003). Gambar 7 menampilkan proses apoptosis atau *programmed cell death* (PCD) yang meliputi sinyal amplifikasi mitokondrial dan melibatkan berbagai macam gen seperti Bax dan Bak.



(Mc Bride, 2004)

Gambar 7. Mekanisme apoptosis atau *programmed cell death* (PCD) yang diinduksi oleh sel T sitotoksik melalui sinyal mitokondrial dan melibatkan sejumlah gen

Menurut Mc Bride dkk., (2004) apoptosis juga merupakan proses aktif dengan menginduksi gen seperti BAX dan ekspresi antigen Fas maupun represi/penekanan simultan gen seperti BCL2. Jika kerusakan selnya berat, sejumlah gen untuk apoptosis yang dikontrol oleh gen *p53* juga berperan dalam pengaturan siklus sel. Hasil penelitian menunjukkan pengaktifan jalur apoptosis oleh *p53* dapat dilakukan dengan mentransfer *p53* jenis ganas (wild type) rekombinan pada sel kanker yang tidak memiliki *p53* atau mengalami mutasi. Dengan demikian terdapat tiga mekanisme apoptosis yang berbeda yang mana sebuah sel melakukan program bunuh diri dengan cara apoptosis. Ketiga mekanisme apoptosis tersebut adalah, pertama dipicu oleh sinyal yang muncul dalam sel itu sendiri, kedua dipicu oleh pengaktif kematian di luar sel yang terikat pada suatu reseptor pada permukaan sel seperti TNF-

limfotoksin dan ligand Fas (FasL) dan ketiga dipicu oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang membahayakan sel.

2.4 Respon Imun terhadap Kanker

Sistem pertahanan tubuh bawaan atau alami dapat mengenali patogen berdasarkan pola berulang dari antigen, misalnya berupa lipopolisakarida (dinding bakteri) dan RNA untai ganda dari virus. Sistem pertahanan tubuh bawaan dapat memberikan respon pertahanan tubuh yang cepat dengan beberapa mekanisme. Berlawanan dengan hal ini, pada sistem pertahanan tubuh adaptif (dapatan) yang melibatkan aktivitas dari sel B dan sel T yang akan memberikan respons terhadap patogen lebih lambat tetapi lebih spesifik terhadap antigen tertentu. Respons pertahanan tubuh bawaan sering kali ditandai dengan proses inflamasi, yaitu respons jaringan lokal terhadap cedera jaringan yang ditandai dengan *rubor* (kemerahan), *calor* (panas), *dolor* (nyeri), dan *tumor* (pembengkakan). Sistem imun bawaan berfungsi untuk membunuh patogen, membatasi penyebaran patogen, memicu aktivasi respons pertahanan tubuh dapatan yang melibatkan aktivasi sel B dan sel T, serta memacu terjadinya perbaikan jaringan. Inflamasi dan respons pertahanan tubuh secara umum memberikan manfaat yang besar bagi manusia untuk mempertahankan hidup. Selain itu, sistem pertahanan tubuh dan respons inflamasi juga dapat mengurangi dan mencegah timbul dan berkembangnya tumor. Meskipun demikian, inflamasi dalam jangka waktu yang lama dapat menyebabkan terjadinya transformasi ke arah neoplasma dan meningkatkan perkembangan tumor. Mekanisme molekuler berkaitan dengan inflamasi dan perkembangan kanker yang melibatkan aktivitas factor transkripsi STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*). Pada keadaan inflamasi kronis, sel tumor dapat mengaktivasi STAT3 dan menjadikannya aktif dengan fosforilasi yang mengakibatkan sel tumor menjadi resisten terhadap apoptosis. Selain itu, STAT3 dapat menyebabkan peningkatan sitokin yang menderegulasi respons pertahanan tubuh terhadap tumor. Tumor dapat menyebabkan inosupresi sistemik dengan meningkatkan aktivitas sel myeloid yang berperan dalam pertahanan tubuh bawaan (Haryono dkk., 2018).

Berbeda dengan sistem pertahanan tubuh alami atau bawaan yang mengenali patogen berdasarkan pola molekul nonspesifik dari

patogen, sistem pertahanan tubuh dapat diperantarai oleh reseptor yang secara spesifik mengenai antigen melalui *T-cell receptor* (TCR) dan *B-cell receptor* (BCR). Respon pertahanan tubuh yang efektif akan tercipta apabila sel B dan sel T dapat mengenali antigen yang kemudian mengalami aktivasi dan proliferasi secara selektif. Proses proliferasi tersebut disebut dengan proliferasi klonal yang dapat memacu terjadinya respons pertahanan tubuh terhadap antigen spesifik dan terbentuknya sel memori yang bertahan hidup lama. Berbeda dengan sel B dan sel T-gamma, sel T (alfa-beta) mengenai protein asing yang telah mengalami pemrosesan dan dipresentasikan sebagai antigen peptide berukuran kecil melalui molekul MHC. Terdapat dua subkelas sel T yaitu sel CD4⁺ yang dapat berikatan dengan antigen yang dipresentasikan melalui MHC kelas II dan CD8⁺ yang berikatan dengan MHC kelas I. Ikatan antara TCR pada sel T dengan CD4⁺ dengan antigen yang dipresentasikan oleh SPC melalui MHC kelas II dapat mengaktifkan sel T menjadi efektor, salah satunya akan mengaktifkan sel B sehingga dapat memproduksi antibody. Selain itu juga mengaktifkan sel NK dan sel T CD8⁺ sitotoksik. Sel T CD4⁺ yang mengenali antigen pada keadaan tanpa adanya inflamasi, akan berdiferensiasi menjadi sel T regulator dan berfungsi sebagai regulator negatif pada sistem pertahanan tubuh. Setelah aktivasi oleh APC, sel T CD8⁺ berfungsi sebagai pembunuh sel secara langsung melalui proses sitotoksitas dan berperan penting dalam respons pertahanan tubuh terhadap kanker. Setelah melaksanakan tugasnya dalam sitotoksitas, sel T CD8⁺ akan mengalami apoptosis. Sebagian sel T CD8⁺ juga akan mengalami diferensiasi menjadi sel T memori (Haryono dkk., 2018)

2.5 Sel T CD4

Sel CD4 adalah jenis sel darah putih atau limfosit. Sel CD4 dapat dibedakan dari sel CD8 berdasarkan protein tertentu yang ada di permukaan sel. Sel CD4 adalah sel T yang memiliki protein CD4 pada permukaannya (Spiritia, 2015).

CD4 merupakan protein transmembran yang berfungsi sebagai ko-reseptor pada sel T *helper*. Ketika reseptor sel T *helper* mengenali kompleks antigen MHC II. CD4 berperan sebagai ko-reseptor yang memperkuat signal transduksi sehingga sel T teraktivasi. CD4

diekspresikan oleh sel T, sel Langerhans, sel dendritik dan monosit (Rifa'I, 2013).

Sel T CD4 memiliki peran penting dalam perlindungan kekebalan tubuh. Mereka membantu sel B membuat antibodi, menginduksi makrofag untuk mengembangkan aktivitas mikrobisida, membawa neutrofil, eosinofil, dan basofil ke tempat infeksi dan peradangan, dan melalui produksi sitokin dan kemokin, berfungsi untuk mengatur respon imun. Kekebalan yang di perantarai sel, atau kekebalan sel T bertugas melawan patogen intraselular dengan cara merusak sel-sel yang terinfeksi. Sel T juga berperan dalam melawan jaringan yang ditransplantasikan dan sel-sel kanker. Sel Th diaktifkan ketika reseptornya berikatan secara spesifik dengan suatu kompleks MHC kelas II dan antigen pada permukaan sel penyaji antigen (APC) melalui TCR. Sel T itu kemudian mensekresi interleukin-2 dan sitokin lain yang mengaktifkan sel-sel B dan sel-sel T sitotoksik. Sebagian besar sel T sitotoksik diaktifkan oleh sitokin dan pengikatan spesifik ke kompleks MHC kelas I. Sel T itu kemudian akan mensekresikan perforin yang membentuk pori (lubang) pada membran sel target dan menyebabkan sel tersebut lisis atau pecah (Campbell, 2004).

Sel Th berdiferensiasi menjadi 2 subset, yaitu Th1 dan Th2. Sel Th1 mensekresi IL-2, IFN- γ , dan TNF- α untuk membantu reaksi pertahanan yang diperantarai makrofag untuk membunuh patogen intraseluler. Sedangkan sel Th2 mensekresi IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, dan IL-13 yang berikatan dengan sel B, sel mast, sel basophil dan eosinophil untuk membantu pertumbuhan dan diferensiasi untuk menunjang respon imun (Antari, 2017).

2.6 Sel T CD8⁺

CD8 cytotoxic T lymphocytes (CTLs) secara langsung mampu membunuh sel tumor. CD4 limfosit T helper (Th) adalah sitokin yang mensekresi heterogen limfosit T. T helper tipe 1 limfosit (Th₁) memiliki peran penting dalam mengaktifkan CTLs. T helper tipe 2 (Th₂) limfosit merangsang kekebalan humoral dan mengaktifkan eosinophil (Arung dkk, 2007).

Sel Tc (sitotoksik) merupakan subset fungsional limfosit T yang mengekspresikan protein CD8, mempunyai aktifitas sitotoksik dengan kemampuan membunuh sel yang mempunyai makromolekul

pada permukaannya. Prekursor sel Tc mengenali antigen pada permukaan sel yang berikatan dengan MHC kelas I. Sel ini berperan penting dalam pertahanan melawan infeksi virus dengan cara melisiskan virus, dan berfungsi dalam *cellular adaptive immunity*, proteksi dan *recovery* infeksi bakteri dan parasit, penolakan transplatasi, imunitas tumor dan autoimun. Sel T CD8 memiliki 2 kategori sel, yaitu *Cytotoxic Lymphocytes* (CTLs) dan sel T supresor. Sel CTLs merupakan bagian dari respon sel Th1, yang penting untuk proses eliminasi sel terinfeksi virus dan sel tumor. Sel ini juga dapat memproduksi sitokin (IL-2, IFN- γ , dan LT (*Limfotoksin*)). Aktivasi sel T CD8 yang diaktifkan oleh APC dan sitokin dari Th1 CD4 yang kemudian terjadi proliferasi dan diferensiasi menjadi sel CTLs dan selanjutnya dapat melisiskan sel terinfeksi dan kategori kedua adalah sel T supresor yang mengendalikan respon Th1 CD4 terhadap antigen spesifik *regulation*, misalnya melalui sekresi (Antari, 2017)

Limfosit Tc yang diaktifkan oleh antigen membunuh sel-sel kanker dan sel-sel yang terinfeksi oleh virus atau patogen intraseluler lainnya. Semua sel bernukleus dalam tubuh secara terus menerus menghasilkan molekul MHC kelas I. Sementara molekul MHC kelas I yang baru disintesis itu bergerak menuju permukaan sel, molekul itu menangkap fragmen kecil dari salah satu protein lain yang disintesis oleh sel tersebut. Jika sel tersebut mengandung sel virus yang bereplikasi, fragmen peptide protein virus itu ditangkap dan diangkut ke permukaan sel. Dengan cara ini, molekul MHC kelas I memaparkan protein asing, yang disintesis dalam sel terinfeksi atau sel abnormal ke sel T sitotoksik. Interaksi antara sel penyaji antigen (APC) dan sel Tc sangat ditingkatkan oleh kehadiran protein permukaan sel T yang disebut CD8. CD8 terdapat pada sebagian besar sel Tc dan memiliki afinitas terhadap sebagian molekul MHC kelas I. Interaksi antara MHC I dan CD8 membantu mempertahankan kedua sel itu tetap menyatu sementara aktivasi antigen yang bersifat spesifik sedang berlangsung. Sel T sitotoksik yang diaktifkan oleh kontak spesifik dengan kompleks MHC kelas I dan antigen pada sel yang terinfeksi atau sel tumor, dan dirangsang lebih lanjut oleh IL-2 dari sel Th yang berdiferensiasi menjadi sel pembunuh yang aktif, sel ini membunuh sel target terutama dengan cara pembebasan perforin, yaitu protein yang membentuk pori atau lubang pada membran target karena ion dan air mengalir kedalam

target maka sel tersebut akan membengkak dan akhirnya lisis. Kematian sel-sel yang terinfeksi itu bukan saja menghilangkan tempat bagi pathogen untuk bereproduksi, tetapi juga memaparkannya ke antibodi yang sedang beredar, sehingga menandainya untuk dibuang dan dihancurkan. Setelah merusak sel yang terinfeksi, sel Tc terus bergerak membunuh sel-sel lain yang terinfeksi dengan pathogen yang sama. Dengan cara yang sama, sel Tc melawan tumor ganas. Sel-sel tumor membawa molekul yang berbeda yang tidak ditemukan pada sel-sel normal, maka sel-sel tumor diidentifikasi sebagai zat asing oleh sistem kekebalan tubuh. Molekul MHC kelas I pada sel tumor menyajikan fragmen – fragmen antigen tumor ke sel Tc (Campbell, 2004)

2.7 Interferon gamma (IFN- γ)

Interferon termasuk keluarga protein yang terlibat dalam pencegahan replikasi virus, penghambatan pertumbuhan sel dan modulasi diferensiasi sel. Selain perannya dalam sel-sel kekebalan, IFN- γ menghambat pertumbuhan sejumlah jenis sel non hematopoietik, termasuk beberapa jenis tumor. Bahkan, itu telah dianggap sebagai agen antitumor (Tunon dkk., 2007)

Awalnya, mereka diklasifikasikan berdasarkan tipe sel yang mengeluarkan tetapi sekarang diklasifikasikan menjadi tipe I dan tipe II menurut spesifisitas reseptor dan urutan homologi. IFN tipe I terdiri dari beberapa sub tipe IFN- α (tergantung spesies), IFN- β , IFN- γ , dan IFN- δ , yang semuanya terkait secara struktural dan berikatan dengan reseptor heterodimerik yang umum. IFN- γ adalah satu-satunya tipe II IFN. Secara struktural tidak terkait dengan IFN tipe I, berikatan dengan reseptor yang berbeda, dan dikodekan oleh lokus kromosom yang terpisah. Pada awalnya, diyakini bahwa limfosit sel helper T CD4 tipe 1 (Th1), Limfosit sitotoksik CD8, dan sel NK secara eksklusif menghasilkan IFN- γ . Produksi IFN- γ oleh APC [monosit / makrofag, sel dendritik] yang bekerja secara lokal mungkin penting dalam aktivasi diri pada sel. Sekresi IFN- γ oleh sel NK dan APC penting dalam pertahanan inang pada awal infeksi, sedangkan limfosit T menjadi sumber utama IFN- γ dalam respon imun adaptif. Produksi IFN- γ dikendalikan oleh sitokin yang dikeluarkan oleh APC, terutama IL-12 dan IL-18. Sitokin ini berfungsi sebagai jembatan untuk menghubungkan infeksi dengan

produksi IFN dalam respon imun bawaan. Pengenalan makrofag dari banyak patogen menginduksi sekresi IL-12 dan kemokin. Kemokin ini menarik sel NK ke tempat peradangan, dan IL-12 mempromosikan sintesis IFN dalam sel-sel ini. Pada makrofag, sel NK dan T, kombinasi stimulasi IL-12 dan IL-18 semakin meningkatkan produksi IFN- (Schroder dkk., 2004).

IFN- dapat meningkatkan ekspresi MHC-I maupun MHC-II. IFN- akan melipatgandakan fase kognitif respon imun dengan memacu ikatan MHC-II dengan limfosit T CD4 dengan pelipatgandaan fase kognitif ini. Secara *in vivo*, IFN- akan mempercepat respon seluler maupun humoral. IFN- akan meningkatkan sel T untuk berdiferensiasi. IFN- akan memacu *naive* CD4 untuk berdiferensiasi ke subset sel Th1 dan menghambat proliferasi Th2 pada percobaan dengan mencit. Efek ini mungkin terjadi karena diperantarai oleh aktivasi sel fagosit mononuklear yang melepaskan IL-12 dan sel T yang mengekspresikan reseptor IL-12. IFN- juga dibutuhkan untuk maturasi sel T sitolitik CD8. IFN- memacu aktivitas sitolitik dari sel-sel NK yang sangat berperan pada imunologi tumor. IFN- juga meningkatkan fungsi TNF di sel-sel endothel (Abbas, 2005).

Interferon gamma mampu meningkatkan antigenisitas sel tumor melalui regulasi ekspresi molekul tumor antigen-presenting MHC, sehingga menyebabkan sel tumor menjadi mudah untuk dikenali oleh sel imun dan memudahkan proses eliminasi. Aktivitas antikanker IFN- dapat ditunjukkan melalui mekanisme regulasi p21 dan p27 untuk menahan siklus sel (Mojic dkk., 2018). P21 adalah family dari *cyclin dependent kinase inhibitors* (CKIs) yang termasuk di dalamnya yaitu p27 dan p57. Protein tersebut memiliki kemampuan untuk meregulasi siklus sel dengan menonaktifkan *cyclin dependent kinase* (CDKs) yang merupakan regulator utama pada siklus sel (Piccolo & Stefania, 2012).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai Juni 2019 dan bertempat di laboratorium Fisiologi dan Perkembangan Hewan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Persiapan Hewan Coba

Mencit (*Mus musculus*) betina diperoleh dari Universitas Gajah Mada, Yogyakarta dengan kriteria berat badan 25-30 gram dan berusia 7-8 minggu. Aklimatisasi dilakukan selama 7 hari pada kandang khusus menyimpan mencit sebelum dilakukan perlakuan injeksi senyawa karsinogenik dengan pemberian makan menggunakan pakan kelinci yang dihaluskan dan ditambahkan dengan tepung terigu lalu dipanggang menggunakan oven dan pemberian minum menggunakan air mineral konsumsi manusia. Percobaan dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Sebanyak 57 mencit betina dibagi menjadi tiga perlakuan, meliputi perlakuan kontrol negatif (normal, K-), kontrol positif (kanker, K+) dan pemberian ekstrak kenikir.

3.3 Desain Eksperimen

Sebanyak 47 mencit dibagi kedalam lima perlakuan, meliputi perlakuan kontrol negatif (normal, N), kontrol positif (kanker, K), kanker dengan dosis ramuan kenikir 50 mg/kg BB (D1), kanker dengan dosis ramuan kenikir 500 mg/kg BB (D2) dan kanker dengan ramuan dosis kenikir 2000 mg/kg BB (D3) (Tabel 1).

Tabel 1. Kelompok perlakuan mencit betina

Kelompok	Keterangan
Normal	Mencit betina sehat tanpa perlakuan DMBA dan kombinasi ekstrak meniran + kenikir
DMBA	Mencit betina hanya diinduksi dengan DMBA
D1	Mencit betina yang diinduksi dengan DMBA dan pemberian ekstrak kenikir 50 mg/kg BB mencit
D2	Mencit betina yang diinduksi dengan DMBA dan pemberian ekstrak kenikir 500 mg/kg BB mencit
D3	Mencit betina yang diinduksi dengan DMBA dan pemberian ekstrak kenikir 2000 mg/kg BB mencit

3.4 Induksi DMBA pada Mencit

Induksi kanker dilakukan dengan melakukan injeksi menggunakan senyawa karsinogen *7,12-Dimethylbenz[a]anthracene* (DMBA). Dosis pemberian sesuai dengan metode menurut Jayakumar dkk., (2014) dengan melakukan beberapa modifikasi. Injeksi menggunakan senyawa DMBA dilakukan secara subkutan yaitu pada daerah sekitar areola atau *fat pad* pada mencit dengan dosis 0,015 mg/g berat badan (BB) mencit. Senyawa DMBA dilarutkan dengan menggunakan minyak jagung. Setiap mencit ditimbang massanya untuk menentukan volume yang dibutuhkan untuk dilakukan dalam sekali injeksi. Induksi menggunakan DMBA dilakukan selama enam minggu setiap satu minggu sekali secara subkutan. Konfirmasi mencit yang terdiagnosis kanker payudara dilakukan dengan 2 cara yaitu morfologi dan histologi. Konfirmasi secara morfologi ditandai dengan timbulnya benjolan di area mammae mencit, kulit menjadi kasar, rambut rontok dan menurunnya keaktifan mencit. Konfirmasi histologi dilakukan dengan mengamati preparat histologi jaringan payudara.

3.5 Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Kenikir (*Cosmos caudatus*)

Pembuatan ekstrak kenikir dilakukan dengan dua tahapan. Tahapan pertama dengan metode maserasi dan tahapan kedua dengan proses *freeze dried*. Pada tahapan pertama, simplisia kenikir kering diperoleh dari Materia Medica, Kota Batu. Simplisia kenikir kemudian direndam dalam pelarut akuades selama 24 jam, setelah itu dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring/saringan. Pada proses penyaringan, ampas dari rendaman simplisia kenikir dibuang kemudian ekstrak kenikir (dalam bentuk cair) dimasukkan ke dalam botol kaca dan diletakkan di dalam lemari pendingin (*freezer*). Pada tahapan kedua, ekstrak kenikir yang beku kemudian dimasukkan ke dalam mesin *freeze dried* dengan suhu 38°C sampai ekstrak kenikirnya menjadi kering. Proses *freeze dried* (pengeringan) bertujuan untuk mengeluarkan/memisahkan hampir sebagian besar air yang ada di dalam ekstrak.

Mencit yang telah diinjeksi dengan DMBA selama 6 minggu, selanjutnya disondekan ekstrak kenikir secara oral dengan dosis yang sudah ditentukan. Pemberian ekstrak kenikir diberikan pada mencit perlakuan dosis 1 (50 mg/kg BB), dosis 2 (500 mg/kg BB) dan dosis 3 (2000 mg/kg BB) sedangkan untuk mencit kontrol sehat (tidak diberi perlakuan) dan sakit (hanya DMBA) tidak diberikan perlakuan ekstrak kenikir. Ekstrak kenikir kering hasil *freeze dried* ditimbang sesuai dengan perhitungan dosis yang telah ditentukan setelah itu dilarutkan dengan akuades. Pada proses penyondean, berat badan mencit dan pembuatan sediaan ekstrak kenikir ditimbang setiap 3 hari sekali dan dilakukan selama 2 minggu setiap harinya.

Metode yang digunakan dalam pembuatan ekstrak kenikir pada penelitian dilakukan dengan dua tahapan yaitu, dengan metode maserasi dan *freeze dried*. Metode maserasi merupakan suatu jenis metode yang dalam pengerjaannya hanya dilakukan dengan merendam simplisia dalam pelarut dan dibiarkan selama 3 hari pada suhu ruangan, setelah 3 hari kemudian simplisia dilakukan penyaringan (Azwanida, 2015).

Haryadi (2013), *freeze dried* (pengeringan beku) merupakan salah satu teknik pengeringan yang biasa digunakan dalam bidang pangan seperti bubuk kopi. Prinsip pengeringan beku ini dimulai dengan proses pembekuan bahan dan dilanjutkan dengan proses

pengeringan; suatu proses untuk mengeluarkan/memisahkan hampir sebagian besar air yang terkandung dalam bahan melalui mekanisme sublimasi.

3.6 Dislokasi Dan Pembedahan pada Bagian Putting Payudara untuk Memastikan Sudah Terinfeksi Kanker Payudara

Mencit yang telah diberikan perlakuan DMBA (7,12-Dimethylbenz[*a*] Anthracene) selama 6 minggu dibunuh dengan cara melakukan dislokasi pada bagian leher, mencit diletakkan pada papan bedah secara terlentang dan difiksasi pada setiap anggota gerakannya dengan menggunakan jarum pentul. Alkohol 70% disemprotkan pada bagian ventral untuk proses sterilisasi dan dicari bagian payudara yang sudah terkena kanker dengan ciri-ciri terdapat benjolan di area mammae mencit. Kemudian setelah ditemukan bagian yang menonjol di area payudara, bagian kulit ditarik dan digunting. Bagian payudara yang telah didapatkan dimasukkan ke dalam botol flakon yang telah berisi formalin 4% yang difungsikan agar organ tersebut tidak rusak. Untuk pembuatan preparat dilakukan di laboratorium patologi fakultas kedokteran Universitas Brawijaya dengan menggunakan perwarnaan HE dan dilakukan pengamatan pada mikroskop.

3.7 Isolasi Organ Spleen

Mencit yang telah diberi treatment ekstrak kenikir selama 14 hari dibunuh dengan cara dislokasi pada bagian leher. Mencit diletakkan terlentang pada papan bedah dan difiksasi setiap anggota gerakannya menggunakan jarum pentul. Alkohol 70% disemprotkan pada bagian ventral untuk proses sterilisasi. Bagian kulit ditarik dan digunting hingga terlihat bagian organ dalam mencit. Organ spleen diisolasi dan dicuci dengan larutan PBS sebanyak dua kali. Organ spleen dihaluskan dengan menggunakan pangkal spuit hingga homogen. Homogenat diambil menggunakan mikropipet tanpa debris (ampas) dan dimasukkan dalam tabung propilen dengan ditambahkan PBS hingga volume 6 mL. Setelah semua suspensi sel dipindahkan, tabung propilen tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm, suhu 10°C selama 5 menit. Hasil sentrifugasi, supernatan dibuang. Kemudian, pelet ditambahkan 1 mL PBS dan diresuspensi.

3.8 Pewarnaan Antibodi Sel CD4⁺, CD8⁺ dan IFN-

Pewarnaan sel T CD4⁺ dan CD8⁺ dilakukan dengan cara pelet yang sudah diresuspensi dibagi kedalam beberapa *micro tube* berkapasitas 1,5 ml yang telah diisi 0,5 ml PBS. Setiap *micro tube* diisi dengan 50 μ l suspensi. Setelah itu, disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit pada suhu 10°C. supernatan hasil sentrifugasi dibuang. Pelet ditambah larutan antibody anti CD4⁺ dan anti-CD8⁺ masing-masing sebanyak 50 μ l, kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu 4°C dalam ruangan gelap lalu ditambah 400 μ l PBS, dan dipindah ke kuvet untuk dianalisis menggunakan *flow cytometer*.

Pewarnaan intraseluler diawali dengan masing-masing *microtube* yang sudah diinkubasi lalu ditambahkan larutan cytofix 50 μ L pada *microtube* dan diinkubasi di *ice box* dengan suhu 4°C selama 20 menit. Setelah inkubasi larutan fiksatif, dicuci dengan larutan *washperm* sebanyak 300-500 μ L kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit pada suhu 10°C. supernatant dibuang dan pelet dari masing-masing *microtube* ditambahkan antibody intraseluler IFN- lalu diinkubasi di *ice box* dengan suhu 4°C selama 20 menit. Suspense pada *microtube* ditambahkan PBS sebanyak 400 μ L, kemudian dimasukkan ke dalam kuvet *flow cytometer* dan dilakukan analisis *flow cytometry* (Patil dkk., 2009).

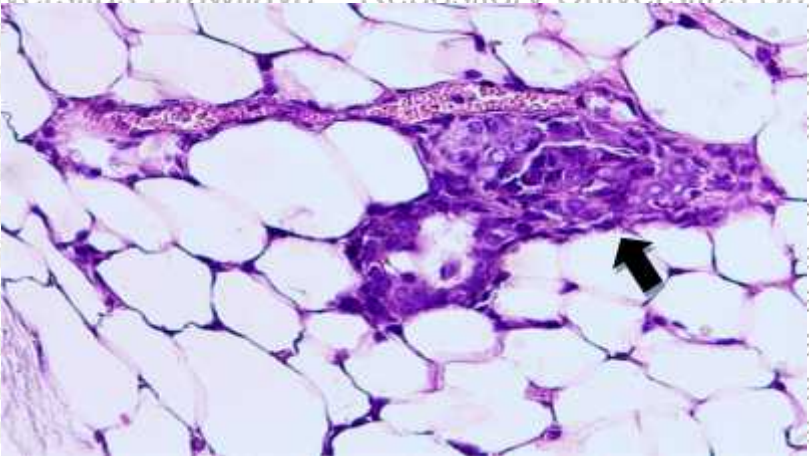
3.9 Analisis Data

Hasil pengukuran menggunakan *flow cytometer*, dianalisis menggunakan BD Cellquest ProTM. Hasil yang didapatkan kemudian dianalisis menggunakan program SPSS versi 16 *for windows*. Data yang digunakan adalah jumlah sel relatif, kemudian diuji dengan uji *One-way ANOVA (Analysis of Variance)* dengan nilai signifikansi sebesar $p < 0.05$ dan dilanjutkan dengan uji Duncan untuk mengetahui beda signifikan pada setiap perlakuan (Gamst dkk., 2008).

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Histologi Kanker Payudara

Berdasarkan hasil pengamatan histologi yang telah dilakukan, jenis kanker yang didapatkan yaitu *Ductal Carcinoma In Situ* (DCIS) (Gambar 8). *Karsinoma duktal in situ* (DCIS) adalah kanker payudara preinvasif (juga disebut non-invasif), di mana proliferasi sel epitel duktus ganas tetap terkurung dalam saluran duktus payudara yang utuh dan tidak keluar dari membrane basal (Barnes dkk., 2012). Tumor tikus tidak terlalu invasif di luar kelenjar susu, memiliki latensi pendek dan jarang bermetastasis (Abba, 2016).



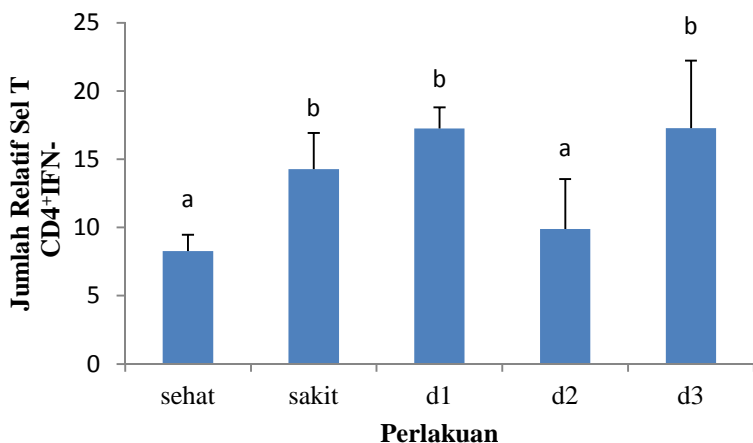
Gambar 8. Histologi Jaringan Payudara Pasca Induksi DMBA.

Tanda anak panah menunjukkan DCIS.

4.2 Hasil Profil $CD4^+IFN^-$

Berdasarkan hasil analisis *flow cytometry* yang telah dilakukan terhadap jumlah relatif sel T $CD4^+IFN^-$, menunjukkan adanya perbedaan nyata antara mencit normal (sehat) dengan mencit yang telah diinduksi oleh DMBA (sakit). Rata-rata jumlah relatif sel T $CD4^+IFN^-$ pada mencit normal lebih rendah dibandingkan dengan mencit sakit, yaitu pada mencit normal memiliki rata-rata jumlah relatif sel limfosit T $CD4$ sebanyak 8,26% sedangkan pada mencit sakit sebanyak 14,28%. Pemberian dosis ekstrak kenikir pada mencit

kanker payudara menunjukkan adanya pengaruh atau beda nyata pada dosis 1 (D1;50 mg/BB) dan dosis 2 (D2;500mg/BB) namun dosis 2 (D2) tidak menunjukkan beda nyata antara mencit sehat maupun sakit, dengan rata-rata jumlah relatif sel T CD4⁺IFN-⁻ pada dosis 1 (D1) sebanyak 17,25% dan pada dosis 2 (D2) sebanyak 9,88% serta terlihat jelas terjadi penurunan jumlah sel CD4⁺IFN-⁻ antara dosis 1 (D1) dengan dosis 2 (D2). Hasil rata-rata jumlah relatif sel T pada dosis 3 (D3;2000mg/BB) sebanyak 17,28% (Gambar 9).



Gambar 9. Jumlah Relatif Sel T CD4⁺IFN-⁻ Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Duncan

Sel T CD4⁺IFN-⁻ pada mencit normal lebih sedikit karena antigen kanker spesifik belum terbentuk sehingga belum direspon oleh sistem imun. Mencit yang sakit memiliki jumlah sel T CD4⁺IFN-⁻ lebih tinggi dibandingkan mencit yang normal, karena sel T CD4⁺IFN-⁻ telah teraktivasi dengan terbentuknya antigen kanker spesifik sehingga menghasilkan respon sistem imun pada mencit. Hal ini sesuai dengan penelitian Criscitiello (2012), pada mencit normal jumlah sekresi sitokin proinflamasi cenderung rendah dibandingkan dengan mencit model kanker payudara karena pada mencit normal respon imun yang diperlukan untuk melawan antigen salah satunya berupa respon imun inflamasi oleh sitokin proinflamasi

TNF- dan IFN- tidak terlalu dibutuhkan. Jumlah relatif sel T CD4⁺ dan sitokin proinflamasi di mencit model kanker payudara mengalami peningkatan, hal tersebut diduga karena terjadi peningkatan respon imun berkaitan dengan meningkatnya aktifitas sel imun terhadap antigen, kanker payudara bertindak sebagai antigen. Sel kanker mengekspresikan antigen yang berbeda dengan sel pada umumnya. Antigen tersebut merupakan produk dari gen yang bermutasi atau dapat juga ekspresi protein normal yang berlebihan. Ekspresi antigen tersebut berfungsi sebagai pengenalan oleh sistem imun untuk menghasilkan respon imun untuk melawan antigen.

Sel T CD4⁺ memiliki peran dalam respon sistem imun melalui aktivasi beberapa sitokin seperti IL-1, IL-2 dan IFN- yang mampu merangsang pematangan sel T sitotoksik (Peters dkk., 2003). IFN- akan menginduksi sel NK dan sel T untuk mengaktivasi TRAIL (*Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*) yang memberikan sinyal kematian sel kanker secara apoptosis melalui caspase (Pindborg, 2000), selain itu sel T CD4 juga berkontribusi dalam membantu infiltrasi sel T CD8 ke lokasi tumor (Koido dkk., 2010).

Pemberian ekstrak kenikir pada D1 dan D3 menunjukkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan pemberian D2. Hasil ini berarti pemberian ekstrak kenikir pada D1 dan D3 belum bisa menurunkan jumlah sel T CD4⁺IFN-⁺ dan hasil yang didapatkan tidak menunjukkan adanya beda nyata pada mencit yang sakit. Pemberian ekstrak kenikir pada D2 mengalami penurunan dari mencit yang sakit. Berdasarkan hasil penelitian ini dengan menggunakan 3 dosis, dosis 2 memiliki efek lebih baik dalam menghambat proliferasi kanker sehingga menurunkan jumlah sel T CD4⁺IFN-⁺ serta mampu mengembalikan kondisi sakit menjadi sehat. Menurut Hui dkk., (2012) studi menunjukkan bahwa flavonoid memiliki banyak manfaat biologis, seperti antioksidan, anti-inflamasi dan anti-tumor. Fitokimia pencegahan kanker, terutama flavonoid mampu menekan atau memblokir perkembangan kanker. Menurut Woo & Kim (2013) flavonoid memiliki efek sebagai penghambat proliferasi kanker, salah satunya adalah dengan menghambat aktivitas protein kinase yang menghambat jalur transduksi sinyal dari membran ke sel inti. Flavonoid menghambat aktivitas reseptor tirosin kinase karena

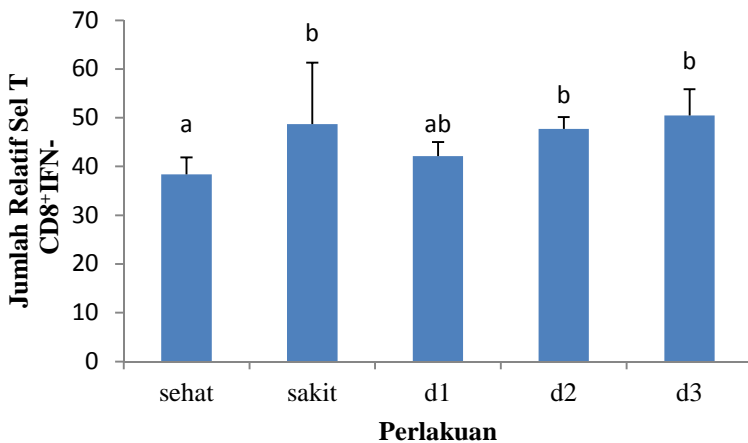
peningkatan aktivitas reseptor tirosin kinase berkontribusi pada pertumbuhan sel kanker.

Secara *in vivo*, IFN- akan mempercepat respon seluler maupun humoral. IFN- akan meningkatkan sel T untuk berdiferensiasi. IFN- akan memacu sel T CD4⁺ untuk berdiferensiasi ke subset sel Th1 dan menghambat proliferasi Th2 pada percobaan dengan mencit. Efek ini mungkin terjadi karena diperantarai oleh aktivasi sel fagosit mononuklear yang melepaskan IL-12 dan sel T yang mengekspresikan reseptor IL-12 (Abbas, 2005).

Sel T CD4⁺ penting dalam respons antigen spesifik primer, serupa CD8⁺ dengan kemampuan mengembangkan sel memori fungsional jangka panjang. Pada imunitas antitumor, sel T CD4 penting dalam memelihara fungsi adaptif dari sel T CD8. Sebaliknya, sel T CD4 atau T regulator (*Treg*) penting untuk mengendalikan respons imun terhadap antigen (Stumpf dkk, 2009).

4.3 Hasil Profil CD8⁺IFN-⁺

Berdasarkan hasil analisis *flow cytometry* yang telah dilakukan terhadap jumlah relatif sel T CD8⁺IFN-⁺, menunjukkan adanya beda nyata antara mencit normal (sehat) dengan mencit yang telah diinduksi oleh DMBA (sakit). Rata-rata jumlah populasi sel T CD8⁺IFN-⁺ pada mencit normal lebih rendah dibandingkan dengan mencit sakit, yaitu pada mencit normal memiliki rata-rata jumlah relatif sel limfosit T CD8 sebanyak 38,36% sedangkan pada mencit sakit sebanyak 48,68%. Pemberian dosis ekstrak kenikir pada mencit kanker payudara menunjukkan tidak adanya pengaruh atau beda nyata pada dosis 1 (D1;50 mg/BB), dosis 2 (D2;500mg/BB) maupun dosis 3 (D3). Dosis 1 (D1) memiliki rata-rata jumlah relatif sel T sebanyak 42,10%, dosis 2 (D2) memiliki rata-rata jumlah relatif sel T sebanyak 47,73% serta dosis 3 (D3) memiliki rata-rata jumlah relatif sel T sebanyak 50,50%. Terjadi kenaikan jumlah sel T CD8⁺IFN-⁺ pada mencit normal dengan mencit sakit dan terjadi penurunan dari mencit sakit ke dosis 1 (D1) lalu terjadi kenaikan dari dosis 1 (D1) ke dosis 2 (D2) dan dosis 3 (D3) (Gambar 10).



Gambar 10. Jumlah Relatif Sel T CD8⁺IFN- γ . Keterangan: Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Duncan

Sel T CD8⁺IFN- γ pada mencit normal memiliki sel T CD8⁺IFN- γ lebih sedikit dibandingkan dengan mencit yang sakit, karena antigen kanker spesifik belum terbentuk sehingga belum direspon oleh sistem imun. Mencit yang sakit memiliki jumlah sel T CD8⁺IFN- γ lebih tinggi dibandingkan mencit yang normal, karena sel T CD8⁺IFN- γ telah teraktivasi dengan adanya antigen kanker spesifik sehingga menghasilkan respon sistem imun pada mencit. Hal ini sesuai dengan penelitian Criscitiello (2012), pada mencit normal jumlah sekresi sitokin proinflamasi cenderung rendah dibandingkan dengan mencit model kanker payudara karena pada mencit normal respon imun yang diperlukan untuk melawan antigen salah satunya berupa respon imun inflamasi oleh sitokin proinflamasi TNF- α dan IFN- γ tidak terlalu dibutuhkan. Jumlah relatif sel D1 dengan dosis paling rendah memiliki hasil yang rendah dari ketiga dosis yang ada. Dosis 2 (D2), terlihat adanya kenaikan dari D1 dan pada D3 terjadi kenaikan pula dari D1 dan D2. Hasil ini berarti pada D1, dapat dikatakan pemberian ekstrak kenikir lebih efektif untuk menghambat proliferasi sel kanker sehingga menurunkan jumlah sel T CD8⁺IFN- γ serta mampu mengembalikan kondisi sakit menjadi sehat meskipun tidak ada beda nyata antara D1 dengan kondisi sehat maupun sakit.

Menurut Woo & Kim (2013) flavonoid memiliki efek sebagai penghambat proliferasi kanker, salah satunya adalah dengan menghambat aktivitas protein kinase yang menghambat jalur transduksi sinyal dari membran ke sel inti. Flavonoid menghambat aktivitas reseptor tirosin kinase karena peningkatan aktivitas reseptor tirosin kinase berkontribusi pada pertumbuhan sel kanker.

Menurut Eshar dkk (2014) sel yang mengandung antigen tumor akan mempresentasikan antigen peptide melalui molekul MHC kelas I yang kemudian berikatan melalui TCR dengan sel T CD8, sehingga mengaktifasi sel T CD8 untuk menghancurkan sel yang mengandung antigen tumor tersebut. Sebagian sel efektor berperan dalam mekanisme anti tumor adalah sel T CD8. Sel limfosit T yang menginfiltrasi jaringan tumor (*Tumor Infiltrating Lymphocyte* = TIL) juga mengandung sel T CD8 yang memiliki kemampuan melisis sel tumor.

Kekebalan spesifik yang dimediasi oleh limfosit T sitolitik diduga berperan sebagai antikanker. Namun demikian, tumor telah mengembangkan berbagai mekanisme seperti *downregulasi*, mutasi, atau hilangnya molekul kelas I HLA untuk melarikan diri dari pengawasan kekebalan berbasis sel T (Gisterek dkk., 2008).

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang didapatkan, ekstrak kenikir yang diberikan pada mencit yang terindikasi kanker payudara memiliki pengaruh nyata pada penurunan jumlah sel T CD4⁺IFN-⁻ namun belum menunjukkan pengaruh nyata pada penurunan jumlah sel T CD8⁺IFN-⁺

5.2 Saran

Perlu adanya tambahan waktu dalam pemberian terapi menggunakan tanaman ini serta perlu di uji pada organ lain selain limfa (*spleen*).

DAFTAR PUSTAKA

- Abba, C. Martin, Yi Zhong, Jaeho Lee, Hyunsuk Kil, Yue Lu, Yoko Takata, Melissa S. Simper, Sally Gaddis, Jianjun Shen, C. Marcelo Aldaz. 2016. DMBA induced mouse mammary tumors display high incidence of activating Pik3ca^{H1047} and loss of function Pten mutations. *Oncogaret*
- Abbas A, Lichtman AH, Pober JS. 2005. **Cellular and Molecular Immunology 5th ed.** Philadelphia: Elsevier-Saunders
- Adnyana, I Ketut., Irvani, Rakhmawati dan Alia, Tri Afifa. 2011. Aktivitas Kemopreventif Kanker dari Ekstrak Etanol Lempuyang Wangi pada Mencit yang Diinduksi DMBA. *Acta Pharmaceutica Indonesia*. 36(1&2): 11-15
- Alison, M.R. 2003. **The Cancer Handbook 2nd Edition.** Nature Publishing. Los Angeles.
- Andarwulan, Nuri, Kusnandar Feri. 2010. **Analisis pangan.** PT.Dian Rakyat : Jakarta
- Androutsopoulos V.P., Tsatsakis A.M., and Spandidos D.A. 2009. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer*. 9:187.
- Antari, Arlita L. 2017. **Imunologi Dasar.** Deepublish. Yogyakarta
- Arifin, Bustanul & Sanusi, Ibrahim. 2018. STRUKTUR, BIOAKTIVITAS DAN ANTIOKSIDAN FLAVONOID. *Jurnal Zarah*. 6(1):21-29
- Arts IC, Hollman PC. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*. 81:317-25S.
- Arung ET, Shimizu K, Kondo I. 2007. Structure-activity relationship of prenyl-substituted polyphenols from *Artocarpus heterophyllus* as inhibitors of melanin biosynthesis in cultured melanoma cells. *Chem. Biodev*. 4:2166-2171
- Aryani, D. C. 2003. **Kajian Aktivitas Antiproliferasi Sel Kanker K-562. (Skripsi).** Departemen TPG Fateta IPB. Bogor.
- Azwanida, NN. 2015. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med. Aromat Plant*. 4:196.
- Barnes Nicola L P, Jane L Ooi, John R Yarnold, Nigel J Bundred. 2012. Ductal carcinoma in situ of the breast. *BMJ* . Vol.344

- Beck, W.T., Mo, Y.Y., dan Bhat, U.G. 2001. Cytotoxic signalling by inhibitor of DNA topoisomerase II. *Biochemical Society*. 29(6): 702-703
- Campbell, Neil A, Jane, B. Reece and Lawrence G. Mitchell. 2004. **Biologi Edisi Kelima, Jilid Tiga**. Erlangga. Jakarta
- Criscitiello, C. 2012. Tumor-associated antigen in breast cancer. *Breast care*. 7:262-266
- De Lemos, M.L., 2001. Effects of soy phytoestrogens genistein and daidzein on breast cancer growth. *Ann Pharmacother*. 35(9):1118-21.
- Duo, J. 2012. Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. *Mol Med Rep*. 5(6): 1453-6.
- Eshar Z, Waks T, & Gross G. 2014. The Emergence of T-bodies/car T cells. *Cancer Journal*. 20:123-126
- Gamst, G., L.S. Meyers, and A.J Guarino. 2008. **Analysis of variance design: A conceptual and computational approach with SPSS and SAS**. Cambridge University Press, New York
- Gisterek Iwona, Irena FRYDECKA, Grzegorz WI TONIOWSKI, Sebastian FIDLER, Jan KORNAFEL. 2008. Tumour-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer. *REP PRACT ONCOL RADIOOTHER*. 205-208
- Hariana., Arief., H. 2008. **Tumbuhan Obat dan Khasiatnya Seri 2**. Penebar Swadaya. Depok
- Hariyadi, Purwiyatno. 2013. Freeze drying technology: for better quality & flavor of dried products. *FoodReview Indonesia*. 8(2):52-57.
- Haryono, Samuel J., Sumadi, Lukman Anwar., Adrian, Salim. 2018. **Dasar-Dasar Biologi Molekuler Kanker Bagi Praktisi Klinis**. Gadjah Mada University. Yogyakarta
- Hidayat Syamsul., Sri, Wahyuni., Sofia, Andalusia. 2008. **Seti Tumbuhan Obat Berpotensi Hias (1)**. Elex Media Komputindo
- Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, Cohn JS, Harvey I, et al. 2008. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*. 88:38-50
- Huang, R.-Y.; Yu, Y.-L.; Cheng, W.-C.; OuYang, C.-N.; Fu, E.; Chu, C.-L. 2010. Immunosuppressive effect of quercetin on

dendritic cell activation and function. *J. Immunol.* 184:6815-6821.

Hui Chang, Xie Qi, Zhang Qianrong, Peng Xiaoli, Zhu Jundong, Mi Mantian. 2012. Flavonoids, Flavonoid Subclasses and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis of Epidemiologic Studies. *PLoS ONE.* 8(1)

Kaido S, Sadamu H, Eiichi H, Yoshihisa N, Akitaka T, Hideo K, Eijiro N, Masaki I, Toshifui O, Jianlin G, & Hisao T. 2010. Regulation of Tumor Immunity by Tumor/Dendritic Cell Fusions. *Review Article Clinical and Developmental Immunology.* Hal.1-12

King, R. J. B. 2000. **Cancer biology (2nd ed.)**. Pearson Education. England

Koirala, N., Pandey, R.P., Parajuli, P., Jung, H.J., Sohng, J.K. 2014. Methylation And Subsequent Glycosylation of 7,8-dihydroxyflavone. *Journal of Biotechnology.* 184:128-37.

Kurniasari, Fuadiyah Nila., Leny Budhi Harti, Ayuningtyas Dian Ariestiningsih, Shinta O. Wardhani, Susanto Nugroho. 2017. **Buku Ajar Gizi dan Kanker**. UB Press, Malang

Lee LL, Lee JSC, Waldman SD, Casper RF, Grynbas MD. 2002. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Present in Cigarette Smoke Cause Bone Loss in an Ovariectomized Rat Model.* 30:917-923

Lenoir V, Canonico MBY, Perrin MH, Martin A, Scholler R. 2005. Preventive and curative effect of melatonin on mammary carcinogenesis induced by dimethylbenz[a]anthracene in the female Sprague-Dawley rat. *Breast Cancer Res.* 7:470-476.

Li, N., Z. Shi, Y. Tang, J. Chen dan X. Li. 2008. Recent Progress On The Total Synthesis Of Acetogenins From Annonaceae. *Beilstein Journal of Organic Chemistry.* 4(48): 4-12.

Lotulung, P.D.N., Minarti dan Kardono, L.B.S. 2005. **Penapisan Aktivitas Antibakteri, Antioksidan dan Toksisitas Terhadap Larva Udang Artemia salina Ekstrak Tumbuhan Asteraceae**. Pusat Penelitian Kimia LIPI

McBRIDE, W.H., CHIANG, C.S., OLSON, J.L., WANG, C.C., HONG, J.H. PAJONK, F., DOUGHERTY, G.J., IWAMOTO, K.S., PERVAN, M., & LIAO, Y.P. 2004. A sense of danger from radiation. *Radiation Research.* 162:1-9.

- Medeiros, P.S. 2016. Raman microspectroscopy for probing the impact of a dietary antioxidant on human breast cancer cells. *Food Funct.* 7(6):2800-10.
- Miyata, Masaaki., Mayasuki Furukawa., Koichi Takahashi , Frank J. Gonzalez and Yasushi Yamazoe. 2001. Mechanism of 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-Induced Immunotoxicity: Role of Metabolic Activation at the Target Organ. *Jpn. J. Pharmacol.* 86:302-309
- Mojić, Marija., Kazuyoshi, Takeda & Yoshihiro, Hayakawa. 2018. The Dark Side of IFN- γ : Its Role in Promoting Cancer Immune Evasion. *International Journal Molecular Science* 19:89
- Marzouk, M.M. 2016. Flavonoid Constituents And Cytotoxic Activity Of *Erucaria Hispanica* (L.) Druce Growing Wild In Egypt. *Arabian Journal Of Chemistry.* 9:411–415
- NEWMAYER, D.D. and FERGUSON, M.S. 2003. Mitochondrial releasing power for life and unleashing the machineries of death *Cell.* 112: 481-90
- Nunez, G., Benedict, M.A., Hu, Y., & Inohara, N. 1998. Caspases: the protease of the apoptotic pathway. *Onc.* 17:3237-3245
- Nurhayati Siti & Yanti Lusiyanti. 2006. APOPTOSIS DAN RESPON BIOLOGIK SEL SEBAGAI FAKTOR PROGNOSA RADIOTERAPI KANKER. *Buletin Alara.* 7(3): 57–66
- Patil, S. H., dkk., 2009. Unmasking oral malodor: a review, *People's Journal of Scientific Research.* 61-7.
- Peters B, Schneider-Stock R, Boltze C, Jager V, Epplwn J, Landt O, Rys J, 7 Roessner A. 2002. Elevated telomerase activity, c-MYC and hTERT mRNA expression: Association with tumour progression in malignant liomatous tumours. *Journall Pathology.* 199:517-525
- Piccolo, Maria Teresa & Stefania, Crispi. 2012. The Dual Role Played by P21 May Influence The Apoptotic and Antiapoptotic Fate in Cancer. *Journal of Cancer Research* 1:189-202.
- Pindborg JJ. 2000. **Textbook Kanker dan Pra Kanker Rongga Mulut.** EGC. Jakarta.
- Pocar P, Fischer B, Klonisch T and Klonisch SH. P. 2005. Molecular interactions of the aryl hydrocarbon receptor and its biological and toxicological relevance for reproduction, *Review, Society for Reproduction and Fertility.* 28:1741–7899.

- Priyatin, Cici., Elisa Ulfiana., dan Sri Sumarni. 2013. Faktor Risiko yang Berpengaruh Terhadap Kejadian Kanker Payudara di RSUP Dr. Kariadi Semarang. *Jurnal Kebidanan*. 5(2):9-19.
- Qing, Wei-Guo, C. J. Conti, M. LaBate, D. Johnston, T. J. Slaga, M. C. MacLeod, 1997. Induction of Mammary Cancer and Lymphoma by Multiple, Low Oral Dose of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in Sencar Mice. *Carcinogenesis*. 18(3): 553-559.
- Qinghu, W., Jinmei, J., Nayintai, D., Narenchaoketu, H., Jingjing, H., Baiyinmuqier, B. (2016). AntiInflammatory Effects, Nuclear Magnetic Resonance Identification And HighPerformance Liquid Chromatography Isolation Of The Total flavonoids From Artemisia Frigida, *Journal Of Food And Drug Analysis*: 24:385-391
- Ren, W., Z. Qiao, H. Wang, L. Zhu dan L. Zhang. 2003. Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Medicinal Research*. Reviews 23 (4):519-534.
- Rifa'i, M. 2013. **Imunologi dan Alergi Hipersensitif**. UB Press. Malang
- Saleh, A., Srinivasula, S.M., Acharya, S., Fishel, R. & Alnemri, E.S. 1999. Cytochrome c and dATP-mediated Oligomerization of Apaf-1 is a Prerequisite for Procaspase-9 Activation. *J.Bio. Chem*. 274(25):1794-1796
- Schroder, Kate., Paul J. Hertzog., Timothy Ravasi., and David A. Hume. 2004. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and function. *Journal of Leukocyte Biology*. Vol.75
- Stumpf M, Haenburg A, Riener MO, et al. 2009. Intraepithelial CD8-positive T lymphocytes predict survival for patients with serous stage III ovarian carcinomas: relevance of clonal selection of T Lymphocytes. *British Jou Ca*. 101:1513-1531.
- Sigma-Aldrich. 2007. 7,12-Dimethylbenz[] anthracene. <http://www.sigmaaldrich.com>. accessed on Mei, 2019.
- Simpson, M. G. 2006. **Plant Systematics**. Elsevier Academic Press. USA.
- Sismindari 2002. **Handout Kuliah Biologi Molekuler**. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta
- Spiritia, Yayasan. 2015. **Lembaran Informasi tentang HIV dan AIDS untuk Orang yang Hidup dengan HIV (Odha)**. Jakarta

- Subowo. 2013. **Imunologi Klinik Edisi ke-2**. Sagung Seto. Bandung
- Sudhakaran Meenakshi, Sagar Sardesai, and Andrea I. Dosef. 2019. Flavonoids: New Frontier for Immuno-Regulation and Breast Cancer Control. *MDPI Journal Antioxidants*. 8:103
- Sudiana, I Ketut. 2008. **Patobiologi Molekuler Kanker**. Salemba Medika. Jakarta
- Tian-yang., Wang., Qing Li., Kai-shun Bi. 2018. Bioactive flavonoids In Medicinal Plants: Structure, Activity And Biological Fateasian. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*. 13: 12–23
- Tuñón Garcia Ignacio, Mónica Ricote, Antonio Ruiz A, Benito Fraile, Ricardo Paniagua and Mar Royuela. 2007. Influence of IFN-gamma and its receptors in human breast cancer. *BioMed Central*. 7:158
- Vanessa, M. Munhoza, R. L., José R.P., João, A.C., Zequic, E., Leite, M., Gisely, C., Lopesa, J.P., Melloa. (2014). Extraction Of Flavonoids From *Tagetes Patula*: Process Optimization And Screening For Biological Activity. *Rev Bras Farmacogn*. 24:576-583
- Wibowo Eru Agung, Sriningsih, Puspita Eka Wuyung, Raafqi Ranasasmita. 2010. The Influence of DMBA (7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene) Regimen In The Development of Mammar Carcinogenesis on Sprague Dawley Female Rat. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*. 1(1): 60-66
- Wijayakusuma H., 2008. **Ramuan Lengkap Herbal Taklukkan Penyakit**. Pustaka Bunda. Jakarta
- Woo HD, dan Kim J. 2013. Dietary flavonoid intake and risk of stomach and colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 7:1011-9.
- Yerlikaya, Pinar Obakan., Elif, Damla Arisan., Ajda Coker-Gurkan & Narcin Palavan-Unsal. 2017. Breast Cancer and Flavonoids as Treatment Strategy. *INTECH*. Hal. 305-326

LAMPIRAN

Lampiran 1. Uji ANOVA sel T CD8⁺IFN- γ

Case Processing Summary

		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
CDBIFNg	sehat	5	100.0%	0	0%	5	100.0%
	sakit	5	100.0%	0	0%	5	100.0%
	d1	5	100.0%	0	0%	5	100.0%
	d2	5	100.0%	0	0%	5	100.0%
	d3	5	100.0%	0	0%	5	100.0%

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CDBIFNg	sehat	.314	5	.119	.819	5	.115
	sakit	.225	5	.200*	.955	5	.774
	d1	.227	5	.200*	.949	5	.730
	d2	.305	5	.145	.876	5	.291
	d3	.253	5	.200*	.902	5	.423

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Descriptives

CDBIFNg		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
sehat		5	38.3640	3.51990	1.57415	33.9935	42.7345	35.65	43.40
sakit		5	48.6820	12.59231	5.63145	33.0466	64.3174	31.11	66.40
d1		5	42.1020	2.93546	1.31278	38.4571	45.7469	37.81	45.50
d2		5	47.7280	2.38134	1.06497	44.7712	50.6848	45.39	51.69
d3		5	50.5020	5.37525	2.40389	43.8277	57.1763	43.89	56.32
Total		25	45.4758	7.55378	1.51075	42.3578	48.5936	31.11	66.40

Test of Homogeneity of Variances

CDBIFNg		df1	df2	Sig.
Levene Statistic				
1.927	4	20	145	

ANOVA

CD8IFNg

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	512.875	4	128.219	2.994	.043
Within Groups	856.548	20	42.827		
Total	1369.423	24			

Post Hoc**Homogeneous**

CD8IFNg

Duncan

perlu kuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
sehat	5	38.3640	
d1	5	42.1020	42.1020
d2	5		47.7280
sakit	5		48.6820
d3	5		50.5020
Sig.		.377	.076

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 2. Uji ANOVA Sel T CD4⁺IFN-⁺

perlakuan

Case Processing Summary

		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
CD4IFNg	sehat	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	sakit	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	d1	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	d2	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	d3	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CD4IFNg	sehat	.275	5	.200 [*]	.833	5	.147
	sakit	.300	5	.160	.884	5	.326
	d1	.214	5	.200 [*]	.891	5	.363
	d2	.296	5	.174	.815	5	.107
	d3	.167	5	.200 [*]	.982	5	.945

a. Lilliefors Significance Correction
 *. This is a lower bound of the true significance.

Test of Homogeneity of Variances

CD4

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.973	4	20	.045

ANOVA

CD4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	347.132	4	86.783	8.895	.000
Within Groups	195.122	20	9.756		
Total	542.254	24			

Robust Tests of Equality of Means

CD4

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Brown-Forsythe	8.895	4	11.367	.002

a. Asymptotically F distributed.

ANOVA

CD4IFNg

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	347.132	4	86.783	8.895	.000
Within Groups	195.122	20	9.756		
Total	542.254	24			

Post Hoc

Homogeneous

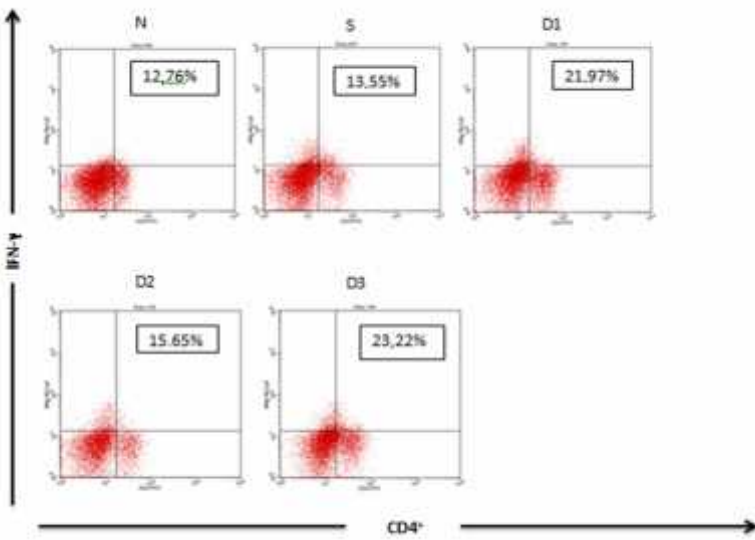
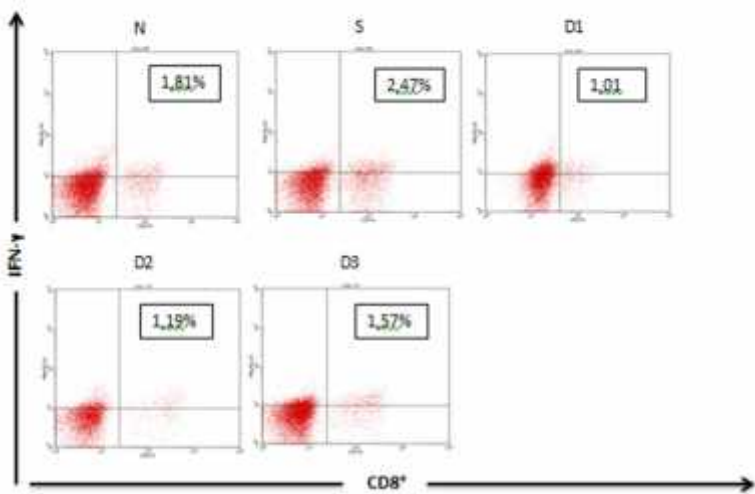
CD4IFNg

Duncan

perlu kuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
sehat	5	8.2640	
d2	5	9.8840	
sakit	5		14.2820
d1	5		17.2500
d3	5		17.2840
Sig.		.422	.165

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 3. *Gate*ing sel T CD8⁺ dan sel T CD4⁺



Lampiran 4

A. Konsentrasi DMBA

Volume pelarut minyak jagung yang digunakan sebagai pelarut DMBA adalah 0,1 mL/mencit (100 μ L)

Berikut ini merupakan rumus perhitungan dalam konsentrasi DMBA yang dilarutkan menggunakan minyak jagung.

$$\text{Konsentrasi (mg/mL)} = \text{Dosis DMBA (mg/g BB)} \times \text{BB rata-rata (g)} \times \text{jumlah mencit (ekor)}$$

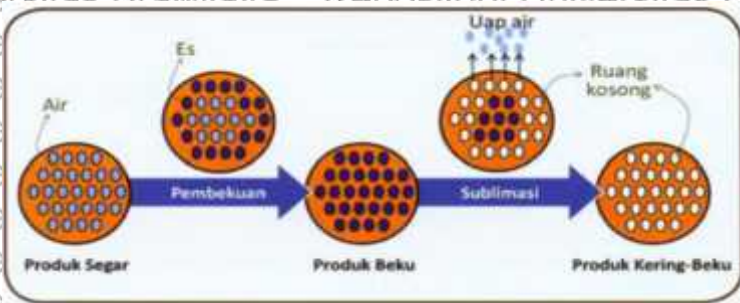
B. Volume DMBA yang diinjeksikan

$$\text{Volume } (\mu\text{L}) = \frac{\text{BB (g)}}{\text{BB rata-rata (g)}} \times 100 \mu\text{L}$$

C. Dosis DMBA

Dosis DMBA yang digunakan adalah 0,015 mg/g BB

Lampiran 5. Mekanisme *freeze dry*



(Hariyadi, 2013)

Skema ilustratif mekanisme terjadinya proses pengeringan beku (*freeze dried*)