

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KENIKIR (*Cosmos caudatus*)
TERHADAP JUMLAH SEL CD11b⁺ DAN B220⁺ PADA MENCIT
(*Mus musculus*) BETINA KANKER PAYUDARA**

SKRIPSI

oleh

ISNANIA WAHYU DARMANINGTYAS

155090101111039



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

MALANG

2019

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KENIKIR (*Cosmos caudatus*)
TERHADAP JUMLAH SEL CD11b⁺ DAN B220⁺ PADA MENCIT
(*Mus musculus*) BETINA KANKER PAYUDARA**

SKRIPSI

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

oleh

ISNANIA WAHYU DARMANINGTYAS

155090101111039



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

2019

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KENIKIR (*Cosmos caudatus*)
TERHADAP JUMLAH SEL CD11b⁺ DAN B220⁺ PADA MENCIT
(*Mus musculus*) BETINA KANKER PAYUDARA**

ISNANIA WAHYU DARMANINGTYAS

155090101111039

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada 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 : Isnania Wahyu Darmaningtyas

NIM : 155090101111039

Jurusan : Biologi

Penulisan Skripsi Berjudul : Efek Pemberian Ekstrak Daun Kenikir
(*Cosmos caudatus*) Terhadap Jumlah Sel
CD11b⁺ dan B220⁺ Pada Mencit (*Mus
musculus*) Betina 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

Isnania Wahyu Darmaningtyas

Efek Pemberian Ekstrak Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*) Terhadap Jumlah Sel CD11b⁺ dan B220⁺ Pada Mencit (*Mus musculus*) Betina Kanker Payudara

Isnania Wahyu Darmaningtyas, Aris Soewondo

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,

Universitas Brawijaya

2019

ABSTRAK

Jumlah penderita kanker payudara terus mengalami peningkatan setiap tahunnya. Kaum wanita memiliki resiko lebih besar untuk terserang kanker ini. Pengobatan medis seperti kemoterapi sering menimbulkan efek samping bagi penderitanya. Penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari efek pemberian ekstrak kenikir (*Cosmos caudatus*) terhadap jumlah sel CD11b dan B220 pada mencit (*Mus musculus*) betina kanker payudara. Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari - April 2019. Metode yang digunakan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yaitu mencit dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok sehat (N), kelompok kanker (K), kelompok kanker yang diberi ekstrak kenikir 50 mg/kg BB (D1), kelompok kanker yang diberi ekstrak kenikir 500 mg/kg BB (D2) dan kelompok kanker yang diberi ekstrak kenikir 2000 mg/kg BB (D3). Hewan coba yang digunakan mencit betina strain BALB/c sebanyak 25 ekor berumur 8 minggu dengan berat badan 25-30 gram. Mencit diinduksi menggunakan DMBA dengan dosis 0,015 mg/gram, diinjeksikan secara subkutan selama minimal 6 minggu. Deteksi kanker dilakukan dengan pengamatan histologi jaringan payudara. Ekstrak kenikir diberikan secara oral selama 14 hari. Pada hari ke 15 organ spleen diisolasi, selanjutnya dilakukan pewarnaan antibodi. Sel kemudian dianalisis dengan *flow cytometry* menggunakan program BD *Cellquest™ Pro*. Data selanjutnya dianalisis menggunakan *software SPSS 16* dengan uji ANOVA satu arah dengan nilai $\alpha=5\%$, dilanjutkan dengan uji Duncan. Pemberian ekstrak kenikir selama 14 hari mampu menurunkan jumlah sel CD11b⁺, akan tetapi belum menunjukkan keefektifitasannya pada jumlah sel B220⁺.

Kata kunci: B220, CD11b, kanker payudara, kenikir

Effect of Giving Kenikir Leaf Extract (*Cosmos caudatus*) on CD11b⁺ and B220⁺ Cell Counts in Mice (*Mus musculus*) Female Breast Cancer

Isnania Wahyu Darmaningtyas, Aris Soewondo

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

2019

ABSTRACT

The number of breast cancer sufferers continues to increase every year. Women have a greater risk of developing this cancer. Medical treatments such as chemotherapy often cause side effects for sufferers. This study was conducted to determine the effect of the effect of giving kenikir extract (*Cosmos caudatus*) to the number of CD11b⁺ and B220⁺ cells in female breast cancer mice (*Mus musculus*). The study was conducted in January - April 2019. The method used was Completely Randomized Design (CRD), namely mice divided into 5 groups, namely healthy group (N), cancer group (K), cancer group given 50 mg / kg BW kenikir extract (D1), the cancer group that was given 500 mg/kg BB (D2) kenikir extract and cancer group who were given 2000 mg/kg BW (D3) kenikir extract. The experimental animals used were strain BALB/c female mice as many 25 with 8 weeks old, a body weight of 25-30 grams. Mice were induced using DMBA at a dose of 0.015 mg / gram, injected subcutaneously for at least 6 weeks. Cancer detection is done by observing histology of breast tissue. Kenikir extract was given orally for 14 days. On the 15th day the spleen organs were isolated, then antibody staining was carried out. Cells were then analyzed by *flow cytometry* using the BD CellquestTMPro program. The data were then analyzed using SPSS 16.0 software with a one-way ANOVA test with a value of $\alpha = 95\%$, followed by the Duncan test. Giving kenikir extract for 14 days can reduce the number of CD11b⁺ cells. However, it has not shown its effectiveness in the number of cells B220⁺.

Keywords: B220, CD11b, breast cancer, kenikir

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 I yang telah mendampingi dan memberi pengarahan serta tambahan ilmu dan saran-saran yang berguna bagi penulis.
2. Bapak Prof. Muhaimin Rifa'i, S.Si., Ph.D. Med. Sc selaku Dosen Pembimbing II yang telah memberi pengarahan serta tambahan ilmu dan saran-saran yang berguna bagi penulis.
3. Ibu Dr. Sri Rahayu, M.Kes dan Bapak Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, M.Si selaku Dosen Penguji yang telah memberi saran yang bermanfaat demi perbaikan penyusunan skripsi.
4. Orang tua atas segala doa, dukungan, dan motivasi yang sudah diberikan.
5. Teman-teman yang selalu mendukung dan memberikan motivasi
6. Rekan-rekan Biologi Angkatan 2015 “*Limfosit*” dan seluruh civitas akademik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

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

Malang, 28 November 2019

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

ABSTRAK	i
ABSTRAC	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
DAFTAR SINGKATAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	1
1.3. Tujuan Penelitian.....	2
1.4. Manfaat Penelitian.....	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Tanaman Kenikir (<i>Cosmos caudatus</i>).....	4
2.2. DMBA (7,12 dimethylbenz(a)anthracen).....	7
2.3. Kanker Payudara.....	9
2.4. Mekanisme Pengenalan Sistem Imun pada sel Kanker.....	12
2.5. Sistem Imun terhadap Kanker Payudara.....	15
2.6. Makrofag (CD11b).....	17
2.7. Sel B220.....	18
BAB III METODE	20
3.1. Waktu Dan Tempat.....	20
3.2. Rancangan Penelitian.....	20
3.3. Persiapan Hewan.....	20
3.4. Induksi Senyawa Karsinogeni.....	21
3.5. Pembuatan Ekstrak dan Pemberian Ekstrak Kenikir.....	22
3.6. Isolasi Organ.....	22
3.7. Pewarnaan Antibodi.....	23
3.8. Analisis Data.....	24
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	25
4.1. Histopatologi Kanker Payudara.....	25
4.2. Jumlah Sel CD11b ⁺	26
4.3. Jumlah Sel B220 ⁺	28

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN 32

5.1. Kesimpulan..... 32

5.2. Saran..... 32

DAFTAR PUSTAKA 33

LAMPIRAN 42

DAFTAR TABEL

Nomor

Halaman

1 Kelompok perlakuan mencit betina 20

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1 Tanaman Kenikir (<i>Cosmos caudatus</i>).....	4
2 Histologi kanker payudara.....	12
3 Fase proses imunoediting kanker.....	14
4 Hasil histopatologi jaringan payudara pasca induksi DMBA...	25
5 Persentase jumlah sel CD11b ⁺ yang pada kelompok perlakuan	28
6 Persentase jumlah sel B220 ⁺ yang pada kelompok perlakuan..	29

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan salah satu penyebab kematian nomor dua di dunia dan jumlah penderita kanker akan terus mengalami peningkatan setiap tahunnya, baik di negara maju maupun di negara berkembang. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (2013), tercatat bahwa prevalensi penyakit kanker di Indonesia sudah mencapai 1,4% atau sekitar 347.792 orang dari total populasi penduduk. Salah satu penyakit kanker yang berkembang pesat adalah kanker payudara sebagian besar di derita oleh wanita, tetapi juga dapat di derita oleh pria dengan persentase rendah. Kanker payudara merupakan sekelompok sel abnormal yang berkembang di area payudara dan pertumbuhannya tidak terkontrol. Tanda atau gejala yang ditimbulkan dari kanker payudara yaitu terdapatnya pembengkakan atau benjolan di sekitar area payudara. Beberapa faktor yang dapat menyebabkan berkembangnya kanker payudara yaitu faktor usia, jenis kelamin, dan dapat disebabkan karena hormon (Alkabban & Ferguson, 2018). Perkembangan sel kanker yang tidak terkontrol menyebabkan perubahan pada sistem seluler secara normal, meliputi pembelahan dan diferensiasi sel yang mengarah pada terganggunya proses apoptosis (Ruddon, 2007).

Sistem imun memiliki potensi yang besar untuk mengeliminasi atau menghancurkan spesifik kanker. Kanker akan dikenal oleh sistem imun sebagai antigen. Berdasarkan penelitian sebelumnya, menunjukkan bahwa kanker dapat dikenali oleh sistem imun dan perkembangannya dapat dikendalikan melalui proses *immunosurveillance* (Finn, 2012). Proses terjadinya pengenalan sistem imun dan respon imun disertai dengan adanya sinyal spesifik, yaitu sitokin proinflamasi (Chen & Ira, 2013). Sel makrofag merupakan bagian dari sistem imun *innate* dan berperan dalam sistem imun *innate* kanker. Aktivasi sistem imun *innate* juga dapat diperhatikan dari respon sel B yang nantinya akan mendorong terjadinya inflamasi sehingga sistem imun *innate* akan dengan mudah mengenali lokasi kanker tersebut berasal (Ostrand & Rosenberg, 2008).

Penderita kanker akan melakukan berbagai upaya pengobatan medis seperti radiasi, operasi dan kemoterapi. Pengobatan medis seperti kemoterapi lebih sering dilakukan oleh pasien untuk menyembuhkan penyakit kanker termasuk kanker payudara. Namun disisi lain, kemoterapi dapat membahayakan bagi sel-sel normal yang ada di dalam tubuh sehingga dapat menyebabkan timbulnya efek samping. Besar kecilnya efek samping yang ditimbulkan dari kemoterapi tergantung dari jenis dan jumlah kemoterapi yang diberikan ke tubuh penderita kanker. Beberapa efek samping yang paling umum ditimbulkan dari hasil kemoterapi adalah kelelahan, mual, muntah, sakit/nyeri, dan rambut rontok. Oleh karena itu, perlu adanya studi penelitian terkait pengobatan alternatif bagi penderita kanker agar tidak menimbulkan efek samping yang berlebihan (Yudissanta & Madu, 2012).

Pengobatan alternatif sebagian besar sumber utamanya berasal dari tanaman (Bunawan dkk., 2014). Tanaman dari Genus *Cosmos* merupakan salah satu tanaman yang berperan sebagai antikanker. Tanaman ini sering dikenal penduduk lokal dengan sebutan kenikir. Kenikir memiliki komponen senyawa seperti flavonoid, saponin, terpenin, dan polifenol. Pebriana dkk., (2008) menjelaskan bahwa senyawa flavonoid dalam ekstrak metanol daun kenikir memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D. Sel kanker payudara T47D merupakan salah satu model sel kanker payudara yang banyak digunakan dalam penelitian. Sel tersebut diambil dari jaringan payudara seorang penderita yang terkena ductal carsinoma. Sel kanker payudara T47D mudah mengalami diferensiasi karena memiliki reseptor estrogen positif (ER+). Penggunaan ekstrak kenikir untuk pengobatan kanker payudara dirasa kurang maka penelitian ini perlu dilakukan untuk mengetahui atau mengkaji lebih dalam terkait efektivitas ekstrak kenikir dalam menurunkan risiko kanker payudara.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dapat diambil dari penelitian ini yaitu bagaimanakah pengaruh dari efek pemberian ekstrak kenikir (*Cosmos caudatus*) terhadap jumlah sel CD11b⁺ dan B220⁺ pada mencit (*Mus musculus*) kanker payudara?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh dari efek pemberian ekstrak kenikir (*Cosmos caudatus*) terhadap jumlah sel CD11b⁺ dan B220⁺ pada mencit (*Mus musculus*) kanker payudara.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat secara teoretis sebagai referensi untuk pengembangan keilmuan bidang Biologi yang terkait Immunologi. Disisi lain juga dapat memberikan pengetahuan kepada masyarakat untuk dapat beralih menggunakan tanaman herbal sebagai pengobatan alternatif untuk menyembuhkan suatu penyakit terutama penyakit kanker jika jalan kemoterapi sudah tidak memberikan hasil yang baik bagi penderita.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kenikir (*Cosmos caudatus*)

Sejak zaman dahulu, manusia telah menggunakan tanaman herba untuk menyembuhkan berbagai jenis penyakit. Tanaman yang berasal dari famili Astereceae digunakan secara tradisional oleh penduduk lokal untuk meningkatkan sirkulasi darah, mencegah penuaan, memberikan kesegaran nafas, mengobati infeksi yang terkait dengan patogen mikroorganisme (Amna dkk, 2013; Mohamed dkk, 2013). Salah satu jenis tanaman yang berasal dari famili Astereceae adalah tanaman kenikir (*Cosmos caudatus*) (Gambar 1).



(Nasir dkk., 2015)

Gambar 1. Morfologi Tanaman Kenikir (*C. caudatus*)

Klasifikasi taksonomi dari tanaman kenikir (*C. caudatus*) adalah sebagai berikut (Moshawih dkk., 2017):

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Asterales
Famili	: Asteraceae
Genus	: Cosmos
Species	: <i>Cosmos caudatus</i>

Penduduk Jawa menyebut tanaman *C. caudatus* dengan sebutan kenikir, sedangkan penduduk Melayu menyebutkan tanaman ini dengan sebutan ulam raja. Kenikir merupakan tanaman yang berumur pendek, termasuk tanaman perdu yang memiliki tinggi antara 75-100 cm dan memiliki aroma yang khas. Kenikir memiliki batang yang tegak, memiliki bentuk seperti segi empat, beralur membujur, bercabang banyak, kemudian beruas dan berwarna hijau keunguan. Daunnya termasuk dalam tipe majemuk, bersilang berhadapan, menyirip, pada bagian ujung daun runcing, memiliki tepi yang rata, dan memiliki panjang 15-25 cm (CCRC, 2014). Kenikir merupakan tanaman yang ditemukan dengan habitat berkelompok, bunganya tumbuh di sepanjang batang, memiliki kelopak bunga berwarna merah muda, merah, kuning atau putih (Hassan & Mahmood, 2007). Keunikan yang dimiliki oleh kenikir yaitu kenikir dapat tumbuh di tanah yang kering dengan kelembapan dan sinar matahari yang baik pula, hanya dengan beberapa faktor tersebut kenikir dapat tumbuh dengan normal (Moshawih dkk., 2017). Kenikir sering dikonsumsi oleh masyarakat sebagai bahan sayuran yang dimasak dengan bumbu atau dikonsumsi dalam keadaan segar seperti salad (Ren dkk., 2003).

Menurut Wahyuni dkk. (2018) tanaman kenikir memiliki kandungan senyawa kimia flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman. Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa phenolik dengan struktur kimia C₆-C₃-C₆. Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil sehingga akan larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, air. Flavonoid terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit, bunga, buah dan biji. Flavonoid yang diekstrak dari buah-buahan dan sayuran memiliki berbagai sifat biologis, termasuk antioksidan, antibakteri, anti-inflamasi, pencegahan antivirus, antikanker. Flavonoid merupakan salah satu senyawa yang paling banyak ditemukan pada tanaman kenikir. Menurut Adawiyah dkk. (2017) daun kenikir (*Cosmos caudatus*) merupakan tanaman tradisional yang dapat mencegah dan mengobati penyakit kanker. Ekstrak daun kenikir mengandung flavonoid dan glikosida kuersetin. Berdasarkan hasil penelitian yang telah ada senyawa flavonoid diketahui mampu memacu kematian sel

kanker payudara T47D melalui mekanisme apoptosis. Mekanisme flavonoid dalam menginduksi apoptosis adalah dengan melalui penghambatan aktivitas DNA topoisomerase I/II, penurunan ekspresi gen Bcl-2 dan Bcl-XL, peningkatan ekspresi gen Bax dan Bak, serta aktivasi endonuklease.

Sel kanker payudara T47D merupakan *continous cell lines* yang morfologinya seperti sel epitel yang diambil dari jaringan payudara seorang wanita berumur 54 tahun yang terkena ductal carcinoma. Sel ini dapat ditumbuhkan dengan media dasar penumbuh RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640. Sel ini termasuk *cell line adherent* yang mengekspresikan ER- β dibuktikan dengan adanya respon peningkatan proliferasi sebagai akibat pemaparan 17 β -estradiol. Sel ini memiliki *doubling time* 32 jam dan diklasifikasikan sebagai sel yang mudah mengalami diferensiasi karena memiliki reseptor estrogen positif (ER/PR-positif). Sel kanker payudara T47D merupakan sel yang sensitif terhadap dokсорubisin (CCRC, 2008).

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. Jika terjadi penghambatan terhadap aktivitas topoisomerase, akan terjadi stabilisasi kompleks topoisomerase-DNA terpotong, sehingga menghasilkan kerusakan *double strand* DNA yang permanen. Kerusakan DNA akan mengaktifasi p53 dan memicu apoptosis. Bax dan Bak merupakan protein proapoptosis sedangkan Bcl-2 dan Bcl-xl merupakan protein antiapoptosis. Bcl2 menempel pada membran luar mitokondria sehingga menghalangi pelepasan sitokrom c sedangkan Bcl-xl berikatan dengan Apaf-1. Sitokrom c dan Apaf-1 diperlukan dalam proses apoptosis melalui jalur intrinsik dengan cara mengaktifasi caspase 9. 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. Apabila ekspresi Bax atau Bak dinaikkan dan Bcl-2 atau Bcl-xl diturunkan, maka akan terjadi regulasi sel ke arah kematian melalui apoptosis. Endonuklease merupakan enzim yang berfungsi melakukan

pemotongan genom DNA sehingga terjadi fragmentasi. Selain itu, juga melakukan pemecahan komponen seluler. Adanya aktivasi terhadap enzim ini akan memperbesar kemungkinan suatu sel untuk melakukan apoptosis (Pebriana dkk., 2008).

Jumlah saponin di dalam daun kenikir hanya sekitar 2%. Saponin merupakan sekelompok glikosida yang tersusun dari gula yang berikatan dengan aglikon. Aglikon memiliki struktur yang terdiri dari rantai triterpenoid dan steroid yang bersifat non polar. Struktur saponin tersebut menyebabkan saponin bersifat seperti sabun atau deterjen. Saponin triterpenoid telah teridentifikasi pada lebih dari 500 spesies tanaman seperti kedelai (*Glycine max*), teh (*Camellia sinensis*), tebu (*Beta vulgaris* L.) sedangkan saponin steroid banyak terkandung dalam tanaman bernilai ekonomis seperti kentang (*Solanum tuberosum*), tomat (*Lycopersicon esculentum*), terong-terongan (*Solanum eleagnifolium*) dan oats (*Avena sativa*) (Yanuartono dkk., 2017).

Menurut Irianti dkk. (2018) senyawa terpenoid dalam ekstrak larut etil asetat daun kenikir (*Cosmos caudatus* H.B.K) dan daun sendok (*Plantago major* L.) memiliki aktivitas sebagai anti-tuberkulosis. Terpenoid merupakan senyawa kimia yang terdiri dari beberapa unit isopren (karbon dan hidrogen, atau karbon, hidrogen dan oksigen) yang bersifat aromatis. Terpenoid umumnya larut dalam lemak dan terdapat dalam sitoplasma sel tumbuhan.

Senyawa fenolik yang terkandung dalam tanaman kenikir dapat berperan sebagai agen antioksidan dalam penghambatan radikal bebas (Mediani dkk., 2013). Antioksidan merupakan senyawa metabolit sekunder yang digunakan untuk mencegah radikal bebas. Semakin tinggi aktivitas antioksidan, semakin banyak radikal bebas yang dicegah. Semakin tinggi total fenol pada suatu bahan pakan berarti akan menunjukkan tingginya aktivitas antioksidan. Fenol merupakan senyawa induk dari fenolik yang banyak terdapat pada tumbuhan (Badriyah dkk., 2017).

2.2 7,12 dimethylbenz(a)anthracen (DMBA)

Kanker dapat dipicu oleh berbagai hal antara lain oleh bahan kimia seperti senyawa 7,12 dimethylbenz(a)anthracen (DMBA) yaitu zat kimia yang termasuk dalam *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH) yang dikenal bersifat mutagenik, teratogenik,

karsinogenik, sitotoksik, dan immunosupresif. Tingkat terjadinya perkembangan kanker akibat induksi oleh DMBA dikaitkan dengan jumlah dosis yang diberikan. Menurut Xue dkk. (2018) induksi DMBA mampu meningkatkan aktivitas dari *aryl hydrocarbon receptor* (AhR) yang berperan dalam proliferasi, metastasis dan angiogenesis sel kanker. DMBA merupakan karsinogen yang poten untuk memicu timbulnya kanker payudara pada tikus (Kubatka dkk., 2002). DMBA juga mengalami aktivasi di hepar dengan proses oksidasi sehingga membentuk karsinogen aktif yang dapat bereaksi dengan DNA. Karsinogenesis dengan DMBA umumnya dapat menyebabkan mutasi pada gen *ras* dan meningkatkan ekspresi Ras dan fos sehingga dapat memacu proliferasi sel (Limtrakul dkk., 2001).

Proses karsinogenesis merupakan proses terjadinya kanker yang diawali dengan adanya kerusakan DNA atau mutasi pada gen-gen pengatur pertumbuhan, seperti gen *p53* (Hanahan & Weinberg, 2000). Mutasi tersebut umumnya disebabkan karena adanya paparan senyawa dari golongan PAH yang dapat berikatan dengan DNA (Rundle dkk., 2000). Proses menuju terjadinya kanker yang progresif umumnya berjalan lama dan melibatkan perubahan-perubahan genetik serta perubahan ekspresi gen yang dapat mempengaruhi sifat pertumbuhan sel. Secara keseluruhan proses karsinogenesis tersebut dapat dibagi menjadi 2 fase yaitu fase inisiasi, yakni fase aktivasi senyawa karsinogen hingga terjadinya mutasi awal, dan fase post inisiasi yang meliputi tahap promosi dan progresi (Hanahan & Weinberg, 2000). Akan tetapi, penyakit kanker umumnya baru diketahui setelah sampai pada tahap progresi hingga sulit dilakukan terapi, karena sudah mengalami kelainan yang majemuk. Oleh karena itu pengembangan terapi kanker perlu dilakukan terhadap kesemua tahap untuk mencegah terjadinya dan perkembangan lanjut dari sel-sel tumor tersebut.

Senyawa DMBA memiliki bentuk padat dan berwarna kuning. Senyawa ini memiliki efek toksik seperti dapat menimbulkan iritasi terhadap kulit maupun mata. Gejala yang ditunjukkan dari senyawa ini jika dilakukan pada hewan percobaan yaitu *skin effect*. Aktivitas karsinogenik dari DMBA terjadi melalui aktivasi metabolisme (biotransformasi) untuk menghasilkan karsinogenesis. Jalur metabolisme dari senyawa DMBA melalui aktivasi enzim sitokrom

P450 yang membentuk *proximate carcinogen* dan *ultimate carcinogen*. *Proximate carcinogen* merupakan jalur metabolit intermediet yang akan mengalami metabolisme lebih lanjut menjadi *ultimate carcinogen*. *Ultimate carcinogen* merupakan metabolit akhir dari karsinogen induk yang akan membentuk DNA *adduct*, yang memicu suatu proses awal inisiasi kanker. Enzim sitokrom P450 dan *microsomal epoxide hydrolase* (mEH) memetabolisme DMBA menjadi dua metabolit yaitu metabolit elektrofilik dan metabolit yang mampu membentuk DNA *adduct*. Sitokrom P450 CYP1B1 mengoksidasi DMBA menjadi 3,4-*epoxides* yang diikuti dengan hidrolisis oleh mEH membentuk metabolit *proximate carcinogenic* dan DMBA 3,4-diol. Metabolit ini nantinya dioksidasi oleh enzim CYP1A1 atau CYP1B1 menjadi metabolit *ultimate carcinogenic* (DMBA-3,4-diol-1,2 *epoxide*) (King, 2000).

Metabolit aktif dari DMBA adalah DMBA-3,4-diol-1,2 *epoxides* yang mampu membentuk DNA *adduct*. Metabolit DMBA yang membentuk DNA *adduct* menentukan mutasi dalam gen dan mampu mengendalikan siklus sel, sehingga mendorong pembelahan sel kanker. Senyawa *epoxide* tersebut nantinya akan berikatan secara kovalen dengan gugus amino eksosiklik *deoksiadenosin* (dA) atau *deoksiguanosin* (dG) pada DNA. Interaksi ini (DNA *adduct*) dapat menginduksi mutasi pada gen-gen penting sehingga menyebabkan inisiasi kanker. Kemampuan metabolit DMBA yang merupakan *ultimate carcinogen* berikatan dengan DNA salah satunya menyebabkan mutasi somatik dari onkogen *Harvey Ras-1* pada kodon 61 kanker payudara dan kanker kulit (De Oliveira dkk., 2015).

2.3 Kanker Payudara

Kanker merupakan penyakit yang disebabkan karena sel yang didalam tubuh mengalami perubahan dan menyebar tanpa terkendali. Sebagian besar sel kanker nantinya akan membentuk sebuah benjolan yang disebut dengan tumor dan penamaan untuk jenis kanker dilihat dari dimana tumor itu berasal (Lee dkk., 2002). Hampir setiap tahun terdapat lebih dari 1,1 juta wanita penderita kanker payudara yang baru dengan total kematian 410.000 (1,6% dari seluruh kematian wanita di dunia). Oleh karena itu, kanker payudara telah menjadi masalah penting dalam dunia kesehatan. Kanker payudara adalah salah satu jenis neoplasma yang terjadi pada

manusia dan sekitar seperempat dari semua kanker yang ada di seluruh dunia penderitanya adalah wanita. Kanker payudara juga dapat terjadi pada pria, tetapi jumlahnya tidak sebanding dengan kaum wanita. Faktor yang dapat menyebabkan berkembangnya kanker payudara yaitu faktor usia, jenis kelamin, dan dapat disebabkan karena hormon (Alkabban & Ferguson, 2018).

Sel kanker dapat berkembang pada usia yang berbeda-beda, hanya saja kejadian kanker payudara banyak terjadi pada populasi wanita menopause. Faktor usia sebagai faktor risiko kejadian kanker payudara diperkuat dengan data bahwa 78% kanker payudara terjadi pada pasien yang berusia lebih dari 50 tahun dan hanya 6% pada pasien yang kurang dari 40 tahun (Nani, 2009). Sel-sel yang ada di dalam tubuh seiring waktu bisa menjadi rusak. Kerusakan sel dapat disebabkan oleh hal-hal seperti asap rokok atau sinar UV dari matahari. Kerusakan sel tersebut bisa diperbaiki oleh tubuh, tetapi terkadang kerusakan tersebut dapat menumpuk seiring bertambahnya usia. Menurut Xu & Taylor (2014) metilasi DNA (suatu proses yang dapat mengganggu aktivitas gen tertentu) sebagai kemungkinan terhadap peningkatan resiko kanker seiring bertambahnya usia. Ketika gen yang difungsikan untuk menekan tumor gagal diaktifkan maka hal tersebut dapat mendorong pertumbuhan kanker. Metilasi DNA dapat meningkat seiring bertambahnya usia.

Jenis kelamin wanita memiliki resiko lebih besar untuk terkena kanker payudara, wanita memiliki lebih banyak sel payudara daripada pria. Seiring dengan bertambahnya usia dan tingkat produktivitasnya (seperti pubertas, masa kehamilan, atau menopause) sel-sel payudara akan terus-menerus terpapar oleh efek pertumbuhan hormon estrogen dan progesteron. Pada pria kanker payudara terjadi ketika masih pada usia muda (Figueroa, 2016).

Wanita memiliki resiko lebih tinggi untuk terkena kanker payudara dibandingkan laki-laki, dikarenakan wanita lebih banyak memproduksi hormon estrogen. Hormon tampaknya juga memegang peranan penting dalam terjadinya kanker payudara. Estrogen merupakan suatu hormon steroid yang memberikan karakteristik seksual pada wanita, mempengaruhi berbagai organ dan jaringan di antaranya terlibat pada regulasi proliferasi sel dan diferensiasi pada wanita. Estrogen menyebabkan perkembangan jaringan stroma payudara, pertumbuhan sistem duktus yang luas, dan deposit lemak

pada payudara. Diduga paparan yang berlebihan dari estrogen endogen dalam fase kehidupan perempuan berkontribusi dan mungkin merupakan faktor penyebab terjadinya kanker payudara (CCRC, 2008).

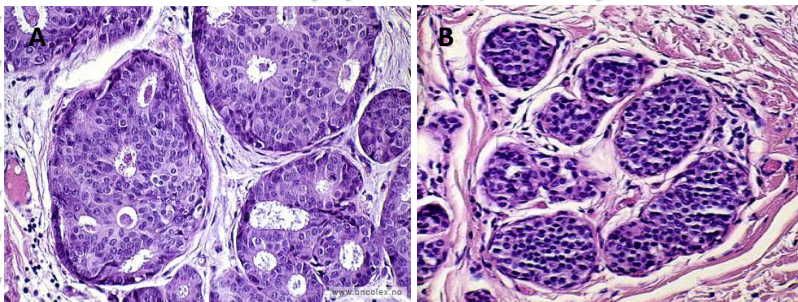
Kanker payudara sebagian besar ditandai dengan adanya gumpalan yang biasanya terasa sakit pada payudara, juga adanya tanda lain yang lebih jarang yang berupa sakit pada bagian payudara, pembesaran dan rasa gatal pada bagian puting, juga secara keseluruhan timbul kemerahan, pembesaran dan kemungkinan penyusutan payudara. Pada masa metastasis dapat timbul gejala nyeri tulang, bahkan penurunan berat badan. Sel kanker payudara dapat tumbuh menjadi benjolan sebesar 1-2 cm dalam waktu 8-12 tahun (Tambunan, 2003). Pada tumor ganas, benjolan tersebut dapat bersifat solid, keras, tidak beraturan.

Mikroanatomi dari payudara memiliki 2 jenis komponen jaringan yaitu epitel dan stroma. Komponen epitel payudara terdiri dari 2 bagian *terminal duct lobular unit* dan *large duct system*. Payudara memiliki sekitar 20 lobus, yang mana disetiap lobusnya memiliki lobus payudara yang mengalirkan sekresi melalui sistem duktus. Pada bagian duktus terdapat bagian yang disebut duktus laktiferus yang letaknya berada di bagian bawah puting dan bagian yang menunjukkan dilatasi kecil disebut dengan sinus laktiferus. Pada bagian stroma payudara terdiri dari sejumlah jaringan ikat longgar dan jaringan adiposa. Jaringan stroma terletak di 2 lokasi yaitu di stroma intralobular dan interlobular. Stroma intralobular menutup setiap lobus, asinus, duktus, dan limfosit yang tersebar. Stroma interlobular memisahkan satu lobus dari yang lain terutama di bagian yang terdiri dari jaringan adiposa dan jaringan ikat longgar (Mohan, 2010).

Pada umumnya tumor pada payudara bermula dari sel epitelial, sehingga kebanyakan kanker payudara dikelompokkan sebagai karsinoma. Sarkoma, yaitu keganasan yang berasal dari jaringan penghubung, jarang dijumpai pada payudara. Berdasarkan asal dan karakter histologinya kanker payudara dikelompokkan menjadi dua kelompok besar yaitu *in situ karsinoma* dan *invasive karsinoma*. Karsinoma *in situ* dikarakterisasi oleh lokalisasi sel tumor baik di duktus maupun di lobular, tanpa adanya invasi melalui membran basal menuju stroma di sekelilingnya. Pada *invasive karsinoma*,

membran basal akan rusak sebagian atau secara keseluruhan dan sel kanker akan mampu menginvasi jaringan di sekitarnya menjadi sel metastatik (Hondermarck, 2003).

Perkembangan kanker payudara akan melibatkan serangkaian peristiwa seperti diferensiasi sel, kemudian proliferasi sel dan apoptosis (Batcioglu dkk., 2012). Mayoritas kanker payudara pada tahap perkembangannya akan diawali dari pra-invasif seperti ADH dan DCIS kemudian berlanjut ke karsinoma invasif hingga puncaknya terjadi metastasis (Ye dkk., 2004). Ada dua jenis utama kanker payudara in situ yaitu *ductal carsinoma in situ* (DCIS) dan *lobular carsinoma in situ* (LCIS) atau dikenal juga sebagai neoplasia lobular (Gambar 2). Karsinoma duktal in situ merupakan suatu kondisi yang mengacu pada di mana sel-sel abnormal menggantikan sel-sel epitel normal yang melapisi saluran payudara dan mungkin memperluas sampai ke saluran dan lobulus. Pada LCIS merupakan suatu kondisi yang mengacu pada sel-sel abnormal yang tumbuh di dalam dan memperluas beberapa lobulus payudara. LCIS umumnya tidak dianggap sebagai awal dari kanker invasif, tetapi merupakan faktor risiko yang kuat untuk mengembangkan kanker invasif (American Cancer Society, 2017).



(Oncolox, 2014)

Gambar 2. Histologi kanker payudara (a). DCIS (b). LCIS

2.4 Mekanisme Pengenalan Sistem Imun pada sel Kanker

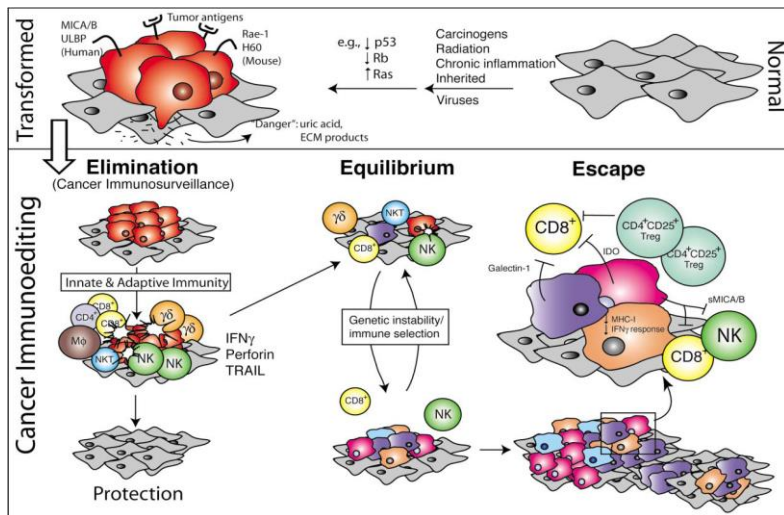
Kanker imunoediting merupakan suatu proses dimana sistem kekebalan tubuh mencoba untuk menghancurkan sel tumor atau kanker yang dilakukan dengan tiga tahapan yaitu, eliminasi, equilibrium dan escape (Gambar 3). Pada tahapan eliminasi lebih

mengacu pada kemampuan sistem imun adaptif dan innate untuk saling berkoordinasi dalam mengenali sel abnormal dalam tubuh dan menghancurkan sel tumor atau kanker sebelum terlihat secara klinis (Mitta dkk., 2014). Pada saat sel normal mengalami perubahan yang disebabkan karena beberapa faktor misalnya paparan senyawa karsinogen, maka sel tersebut akan mengekspresikan molekul yang nantinya akan dikenal oleh sistem imun sebagai benda asing dan harus segera dihancurkan atau dikeluarkan dari tubuh. Molekul dari antigen tumor akan dipresentasikan oleh MHC I, dimana molekul ini akan dikenali oleh sel T CD8⁺ sitotoksik atau sel NK. Sel NK akan mendeteksi sel-sel yang akan mengalami perubahan akibat paparan dari senyawa karsinogen tersebut melalui pertemuan antara sel tersebut dengan ligan spesifik pada sel tumor atau kanker. Sel NK akan menginduksi proses apoptosis pada sel kanker dengan memproduksi molekul sitotoksik melalui sitotoksik seluler yang bergantung pada antibodi (ADCC) (Pandya dkk., 2016).

Sel dendritik atau makrofag kemudian akan memfagosit sel tumor atau kanker yang mati dan melemahkan antigen tumor sel T CD8⁺, sel T CD4⁺, sel NK atau sel B. Sel T efektor yang teraktivasi kemudian akan mensekresikan sitokin proinflamasi IFN γ yang sangat berperan penting dalam menghambat proliferasi sel tumor atau kanker dan angiogenesis (Dunn dkk., 2006). Sedangkan sel B yang teraktivasi akan menghasilkan antibodi spesifik tumor yang dapat memediasi ADCC oleh sel NK serta sel T CD8⁺ dan CD4⁺. Sel T CD8⁺ sitotoksik akan menginduksi proses apoptosis pada sel tumor atau kanker melalui sekresi perforin serta interaksi dengan reseptor Fas dan TRAIL. Sel T efektor juga berperan dalam mengekspresikan co-stimulator seperti CD28, OX40 dan CD137 untuk memediasi proliferasi sel T tersebut (Finn, 2012).

Meskipun mekanisme immunosurveillance pada kanker sudah sangat kuat, namun ada beberapa sel tumor yang dapat melarikan diri dari pengontrolan sistem imun. Pada tahap ekuilibrium, sel kanker yang lolos dari pengontrolan sistem imun yang masih bertahan dalam keadaan dormansi. Pada saat keadaan dormansi terjadi keseimbangan antara produksi sitokin anti tumor (IL-12 dan IFN γ) dengan sitokin yang mendukung tumor (IL-10 dan IL-23) (Mitta dkk., 2014). Pada tahapan ini sel kanker akan mengalami proses editing secara genetik maupun epigenetik sehingga ketika sel limfosit dan INF- γ

mengeleminasi sel kanker maka beberapa varian dari sel tumor asli akan terbunuh namun akan ada varian sel tumor yang telah bermutasi akan muncul kembali. Hal ini dikarenakan pada saat proses editing akan mengakibatkan sel kanker menjadi sel non-imunogenik, sehingga terjadi penghambatan pengenalan dari sel NK serta sel T CD8⁺ dan CD4⁺ (Wu dkk., 2013).



(Dunn dkk., 2004)

Gambar 3. Fase proses imunoediting kanker

Pada tahapan *escape*, pertumbuhan tumor terus berlanjut tanpa adanya tekanan dari sistem imun dan dapat terdeteksi secara klinis. Untuk menghindari pengenalan sistem imun, sel kanker akan sering menurunkan ekspresi antigen tumor dan MHC I. Sel kanker akan terus meningkatkan kualitas hidupnya dengan cara meningkatkan resistensi terhadap apoptosis melalui pengikatan ekspresi molekul anti-apoptosis seperti Bcl-2 (Mittal dkk., 2014). Pada tahapan *escape* sel kanker mampu menekan fungsi kekebalan tubuh, yaitu dengan mensekresikan sitoktoksin supresor seperti IL-10, TGF-beta dan IL-6 (Mellman dkk., 2011).

2.5 Sistem Imun terhadap Kanker Payudara

Sistem imun berperan dalam melindungi atau sebagai pertahanan tubuh terhadap penyakit dan infeksi yang disebabkan oleh bakteri, virus, jamur atau parasit. Hal ini dikarenakan pertahanan pertama tubuh tidak dapat menetralkan agen infeksi sehingga agen infeksi tersebut menyebar dan beredar melalui peredaran darah. Pertahanan pertama yang bertanggung jawab atas agen infeksi tersebut adalah sel imun non spesifik (sistem *innate*) seperti makrofag, sel dendritik, sel monosit, neutrofil, basofil, dan sel mast. Sistem *innate* disebut juga sebagai sistem kekebalan bawaan. Mekanisme ini selalu siap untuk mempertahankan tubuh dari infeksi. Mereka akan bertindak dengan sangat cepat jika didalam tubuh terdapat benda asing. Jika sel-sel tersebut tidak dapat menetralkan agen infeksi maka akan terjadinya proses penginfeksi dan kemudian sistem pertahanan kedua (sistem adaptif) akan aktif setelah terjadi komunikasi antara sel imun yang didahului dengan adanya sekresi sitokin dan ekspresi peptida antigen ke permukaan sel imun nonspesifik atau yang dikenal dengan APC dan selanjutnya akan mengaktifkan sel T dan sel B (Janewaay dkk., 2001).

Respon imun *innate* berperan penting dalam hal mediasi sel yang melibatkan sel fagosit dan sel NK. Sel fagosit yang terlibat yaitu seperti neutrofil, monosit, dan makrofag ikut berperan dalam melindungi host secara langsung dengan mengekspresikan sel non-self-antigen yang dapat langsung membunuh patogen yang masuk dengan bantuan enzim lisosom. Di sisi lain, sel NK berperan dalam melindungi sistem kekebalan tubuh dengan menggunakan suatu protein yang disebut dengan *histokompatibilitas kompleks I* (MHC kelas I) yang diekspresikan di semua permukaan sel. Sel-sel NK ini mengeluarkan perforin dan granzim untuk menginduksi apoptosis sel-sel yang memiliki ekspresi MHC kelas I yang abnormal jika patogen telah diekspresikan. Sel-sel lain seperti eosinofil, basofil, dan sel mast yang melepaskan mediator inflamasi juga berkontribusi dalam kekebalan bawaan dengan cara mengambil lebih banyak sel imun untuk dibawa ke daerah inflamasi yang terluka. Pada manusia protein yang dikenal sebagai HLA merupakan protein yang setara dengan MHC yang ditemukan di sebagian besar pada makhluk vertebrata.

Perkembangan tumor dipengaruhi oleh banyak faktor salah satunya faktor lingkungan, khususnya lingkungan mikro yang ada disekitar daerah tumor. Inflamasi merupakan reaksi dari suatu jaringan yang terpapar iritasi atau infeksi. Berbagai produk pro-inflamatori diketahui memiliki peran dalam mensupresi apoptosis, meningkatkan proliferasi, angiogenesis, invansi dan metatasis. Produk inflamatori yang dihasilkan yaitu seperti TNF, IL- α 1, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, dan khemokin. Inflamasi kronik sering dihubungkan dengan tumorigenesis, termasuk transformasi sel, proliferasi, dan metastasis. Penderita kanker payudara saling terikat erat dengan sistem imunitas, pada umumnya penderita kanker memiliki *immunologic surveillance* yang lemah. *Immunologic surveillance* tidak dapat dipisahkan dari peran limfosit T dan *antigen presenting cell* (APC). Limfosit T bertindak sebagai efektor dalam respon imun, tetapi juga dapat bertindak sebagai regulator respon imun karena kemampuannya dalam mempengaruhi aktifitas sel imunokompeten lainnya melalui limfokin yang dilepaskan. Limfosit T helper (Th) dan T supresor (Ts) sangat berpengaruh terhadap produksi imunoglobulin oleh limfosit B. Respon imun humoral dalam bentuk antibodi terhadap tumor selalu memerlukan bantuan efektor imun seluler (Lestari, 2012).

Komponen efektor pada sistem imun yang memiliki kemampuan untuk bereaksi dengan sel tumor yaitu: limfosit T, *antibody dependent cellular cytotoxicity* (ADCC), sel NK dan makrofag. Pengawasan secara langsung dilakukan oleh limfosit T sitotoksik (CD8⁺). Subset ini mensekresikan limfokin yang berpengaruh langsung dalam melisis sel tumor melalui pengerusakan membran sel dan nukleus. Sedangkan pengawasan secara tidak langsung, dilakukan oleh limfosit T helper (CD4⁺). Subset ini menghasilkan limfokin yang dapat mengaktivasi sel efektor lain dan menginduksi terjadinya respon inflamasi. Sel efektor lain yang diaktivasi meliputi Tc, makrofag, sel NK dan sel B. Sel-sel tersebut kemudian akan menghasilkan limfokin lain seperti TNF yang dapat melisis sel tumor secara langsung (Lestari, 2012). Untuk melakukan fungsi-fungsi tersebut dengan baik, maka limfosit T perlu melalui proses aktivasi sebelumnya. Aktivasi limfosit T terjadi karena pengenalan antigen yang telah diproses oleh APC.

Kemudahan limfosit T menjadi aktif, dipengaruhi oleh kualitas interaksi APC dalam hal ini adalah limfosit T helper.

2.6 Makrofag (CD11b)

CD11b merupakan anggota dari famili integrin yang berpasangan dengan CD18 untuk membentuk heterodimer CR3. Sel CD11b merupakan reseptor permukaan pada monosit, neutrofil, sel NK, granulosit dan makrofag yang berperan dalam proses imunologi termasuk proses fagositosis leukosit (Fossati-jimack dkk., 2013). Secara fungsional, CD11b bekerja untuk mengatur migrasi leukosit untuk memediasi respon inflamasi. Berdasarkan studi sebelumnya menunjukkan bahwa CD11b terbukti berkontribusi atau berperan terhadap aktivitas sel, kemotaksis dan sitoksitas (Varga dkk., 2007).

Makrofag merupakan mediator seluler yang berperan dalam imunitas antitumor. Peranan dari makrofag dimulai dari pertahanan host dalam melawan antigen, penyembuhan luka dan regulasi sistem imun. Ada dua kemungkinan diferensiasi yang terjadi pada makrofag yaitu makrofag tipe 1 (M1) dan makrofag tipe 2 (M2). Lipopolisakarida dan IFN- γ mengarah pada aktivasi makrofag tipe 1 (M1). Aktivasi yang terjadi pada M1 akan menghancurkan mikroba yang masuk atau yang ada di dalam tubuh, menghilangkan sel tumor, mempresentasikan antigen ke sel T untuk respon imun adaptif, serta memproduksi sitokin pro-inflamatori. Makrofag tipe M1 mampu menghasilkan sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 atau IL-23. Makrofag yang diaktifkan oleh IFN- γ mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan sel tumor. Paparan dari sitokin seperti IL-4, IL-10, IL-13 akan mengarah pada aktivasi makrofag tipe 2 (M2).

Tumor Associated Macrophages (TAM) dapat ditemukan di lingkungan mikro tumor yang diketahui dapat mendorong terjadinya tumorigenesis. TAM merupakan karakteristik dari makrofag tipe 2 (M2) yang berperan dalam mendukung perkembangan tumor. TAM dapat mengubah respon kekebalan pada host dengan beberapa mekanisme seperti penghambatan aktivasi sel T dan penghambatan viabilitas sel T. TAM berperan dalam mendorong terjadinya proses angiogenesis pada tumor, yang mendukung pembentukan pembuluh darah baru dan mempertahankan metastasis (Ugel dkk., 2015).

2.7 Molekul B220

Sel B dan produksi antibodinya adalah suatu elemen dari imunitas humoral yang berperan melindungi dan sebagai bagian dari sistem imun adaptif. Kerusakan atau kegagalan dalam perkembangan sel B akan menyebabkan autoimun, imunodefisiensi, dan alergi. Sel B berkembang di dalam sumsum tulang dari sel induk hematopoietik (HSC). Bone marrow merupakan tempat perkembangan dari sel induk hematopoietik (Pieper dkk., 2013).

B220 merupakan molekul yang terdapat di permukaan sel B dan terekspresi pada proses awal perkembangan dari sel B (Murphy, 2012). CD45/B220 adalah glikoprotein dari membran sel utama yang diekspresikan pada semua jenis sel *haematopoietic* kecuali trombosit dan eritrosit. CD45/B220 berperan penting dalam pengaturan proliferasi dan diferensiasi sel. B220 berperan dalam proses apoptosis atau kematian sel terprogram. Apoptosis adalah proses yang penting untuk perkembangan organisme multiseluler dan pemeliharaan homeostasis dalam berbagai sistem biologis, termasuk dalam sistem kekebalan tubuh (Oka dkk., 2000). B220 memiliki peranan sebagai jalur perkembangan sel B yang nantinya akan mengekspresikan molekul CD45R pada sel progenitor, sumsum tulang belakang, dan sel B yang teraktivasi.

Sel limfosit B merupakan kumpulan populasi sel yang mengekspresikan berbagai reseptor immunoglobulin (Ig) di permukaan sel nya untuk mengenali berbagai macam epitop spesifik dari antigen. Imunitas humoral diperankan oleh sel limfosit B yang berasal dari *hematopoietic stem cell* dan dimatangkan pada sumsum tulang. Sel limfosit B penting diketahui karena merupakan sel yang secara khusus membentuk antibodi berupa immunoglobulin-D (IgD), IgM, IgE, dan IgA. Immunoglobulin-D banyak ditemukan di limfosit B, antibodi IgM sebagai garis pertahanan pertama tubuh untuk melawan infeksi, saat pertama kali terinfeksi bakteri atau kuman lainnya. Antibodi IgG adalah antibodi yang paling banyak di temukan dalam darah dan cairan tubuh lainnya. Antibodi ini melindungi dari infeksi dengan "mengingat" kuman yang telah masuk sebelumnya. Sel B mempunyai sinyal reseptor yang berupa B220 (CD45). Proliferasi dan aktivasi sel limfosit B tidak terlepas dari peranan Sel T helper/sel Th (CD4) yang dapat membantu dalam mensekresikan sitokin. Sel Th dalam keadaan naive (tidak

teraktivasi dengan antigen) dilengkapi dengan molekul adhesi pada permukaannya yang berupa L-selektin (CD62L). Molekul L-selektin (CD62L) hilang dari permukaan sel Th seiring dengan adanya antigen atau agen inflamasi, dan sebagai responsnya sel Th akan mensekresikan sitokin yang dapat membantu terhadap proliferasi dan aktivasi sel limfosit B (Hefni dkk., 2013).

Menurut Schwartz dkk. (2016), sel B memiliki peranan dalam kekebalan anti-tumor dengan menunjukkan adanya penurunan pertumbuhan tumor pada hewan coba tikus. Sel B juga memiliki peran dapat menghambat imunitas tumor yang dimediasi oleh CTL. Sel B dapat mempromosikan tumorigenesis dan perkembangan tumor dengan berkontribusi pada lingkungan mikro angiogenik dan proinflamasi, dan dengan secara langsung atau tidak langsung menekan aktivasi sel T. Bukti dari tikus yang mengembangkan kanker, secara spontan menunjukkan peran protumoral sel B karena produksi sitokin, misalnya IL-10 dan IgG yang dapat membentuk kompleks antibodi antigen. Hal ini dapat memfasilitasi perkembangan tumor melalui degradasi matriks ekstraseluler dan peningkatan angiogenesis.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari – April 2019. Penelitian dilakukan di Laboratorium Anatomi Fisiologi dan Perkembangan Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini bersifat RAL (Rancangan Acak Lengkap) dan dilakukan secara *in vivo* pada mencit (*Mus musculus*) betina strain BALB/c umur 8 minggu dengan berat badan $\pm$ 25 gram. Dua puluh lima ekor mencit betina BALB/c dibagi dalam lima kelompok masing-masing lima ekor setiap perlakuan: mencit sehat (tanpa perlakuan), mencit sakit dengan induksi DMBA, mencit dengan induksi DMBA & ekstrak kenikir 50 mg/kg BB mencit (D1), mencit dengan induksi DMBA & ekstrak kenikir 500 mg/kg BB mencit (D2), dan mencit dengan induksi DMBA & ekstrak kenikir 2000 mg/kg BB mencit (D3). Berikut merupakan tabel kelompok perlakuan mencit betina pada penelitian ini.

Tabel 1. Kelompok perlakuan mencit betina

Kelompok	Keterangan
Sehat	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

3.3 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian yaitu mencit (*Mus musculus*) betina strain BALB/c diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada (LPPT

UGM) Yogyakarta. Pemeliharaan dan penanganan hewan dilakukan di Laboratorium Anatomi Fisiologi dan Perkembangan Hewan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Mencit terlebih dahulu di aklimasi dalam kandang yang berisi sekam dengan suhu ruangan sekitar 28-32°C selama satu minggu dan diberi makan berupa pelet yang dibuat seperti *cookies* serta diberi minum air *aqua* setiap 3 kali dalam seminggu. Penggantian sekam, dilakukan setiap 2 kali sekali dalam satu minggu agar kondisi tempat tinggal/kandang mencit tetap dalam keadaan bersih. Sekam yang digunakan berasal dari serbuk kayu.

3.4 Induksi Senyawa Karsinogenik Pada Mencit

Dua puluh lima ekor mencit betina *BALB/c* yang berumur 8 minggu (kecuali kelompok normal) yang akan diinjeksi dengan senyawa karsinogenik berupa *7,12-dimethylbenz[a]anthracene* (DMBA) yang diperoleh dari Gamma Scientific Biolab, Cemorokandang, Malang. Berdasarkan Currier dkk. (2005) dosis DMBA yang digunakan sebesar 0,015 mg/g BB dan dilarutkan dengan minyak jagung. Minyak jagung *Tropicana Slim* salah satu jenis minyak jagung yang digunakan dalam penelitian untuk melarutkan senyawa DMBA karena minyak tersebut bersifat stabil. Pada umumnya minyak jagung sering digunakan dalam penelitian karena minyak tersebut kaya akan asam lemak tidak jenuh, yaitu asam linoleat dan linolenat. Pada minyak jagung ini tidak ditemukannya kandungan mineral yang berupa zat besi ataupun kalsium.

Berat badan dari setiap mencit ditimbang terlebih dahulu untuk menentukan volume DMBA yang akan diinjeksikan ke mencitnya. Proses injeksinya dilakukan secara subkutan di bagian sekitar kelenjar *mammæ* mencit betina. Proses penginjeksian dilakukan sebanyak satu kali dalam seminggu dengan jangka waktu selama 6 minggu dan dilakukan setiap hari rabu pukul 10.00 WIB. Selama proses injeksi, dilihat juga secara morfologinya gejala yang ditimbulkan dari proses penginjeksiannya disekitaran kelenjar payudara (*mammæ*) mencit. Gejala yang dapat teramati yaitu berupa benjolan dan rontoknya bulu disekitar area injeksi. Pada minggu ke-5 diambil secara random sebanyak 1-2 mencit untuk dilakukan uji konfirmasi kanker secara histopatologi dengan cara membedah dan

mengambil jaringan payudara mencit kemudian diberikan ke Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang untuk dilakukan proses pembuatan preparat.

3.5 Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Kenikir

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) dimasukan ke dalam botol kaca dan diletakkan di dalam lemari pendingin (*frezeer*). 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), dosis 2 (500 mg/kg) dan dosis 3 (2000 mg/kg) 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.

3.6 Isolasi Organ Spleen

Jika sudah terbukti kanker secara histopatologi dan sudah diberi perlakuan pemberian ekstrak kenikir selama 2 minggu, selanjutnya organ mencit yang akan digunakan diisolasi. Mencit disklokasi terlebih dahulu dibagian lehernya hingga tidak menunjukkan aktivitas/pergerakan, kemudian mencit diposisikan terlentang. Pada bagian abdomen disemprotkan alkohol 70% sebagai proses

sterilisasi, untuk pengambilan kelenjar payudara mencit terlebih dahulu dibersihkan dari bulu-bulunya yaitu dengan cara mengkerok bulunya menggunakan silet. Mencit dibedah untuk diambil organ limpa/spleen. Organ yang sudah terambil dicuci dengan larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*). Spleen dihaluskan dengan pangkal *syringe* searah jarum jam hingga homogen. Suspensi sel diambil dengan menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung propilen dan disetarakan volumenya dengan menambahkan PBS. Suspensi sel yang berada di dalam tabung propilen disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm pada suhu 10°C selama 5 menit. Hasil sentrifugasi berupa *supernatant* dan *pellet*. *Supernatant* dibuang, kemudian *pellet* diambil dan diresuspensi dengan menambahkan 1 mL PBS.

3.7 Pewarnaan Antibodi

Pelet yang sudah diresuspensi kemudian dipindahkan ke dalam *microtube*. Sebanyak 400 μ L PBS dimasukkan ke dalam *microtube* yang berisi sel dan disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm dengan suhu 10°C selama 5 menit. Pelet hasil sentrifugasi dipisahkan dari *supernatant*, *supernatant* dibuang kemudian pelet diwarnai dengan 50 μ L antibodi monoklonal *FITC-conjugated rat anti-mouse CD11b* dan *PE-conjugated rat anti-mouse B220* dan di inkubasi di dalam *ice box* selama 20 menit pada suhu 4°C. Setelah itu ditambahkan dengan *cytofix* sebanyak 50 μ L dan di vortex kemudian diinkubasi dalam *ice box* pada suhu 4°C selama 20 menit setelah itu ditambahkan *washperm* sebanyak 500 μ L dan diresuspensi. Hasil dari resuspensi disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm dengan suhu 10°C selama 5 menit. *Supernatant* dibuang, pelet ditambahkan 50 μ L antibodi *PE/Cy5-conjugated rat anti-mouse α -IL-6* kemudian diresuspensi dan disimpan di dalam *ice box* pada suhu 4°C selama 20 menit. Sel yang sudah terwarnai dengan antibodi ekstraseluler dan intraseluler kemudian ditambah dengan 400 μ L PBS dan diresuspensi dengan cara di vortex, setelah itu dipindahkan ke kuvet dan dilakukan analisis menggunakan *flow cytometer*.

3.8 Analisis Data

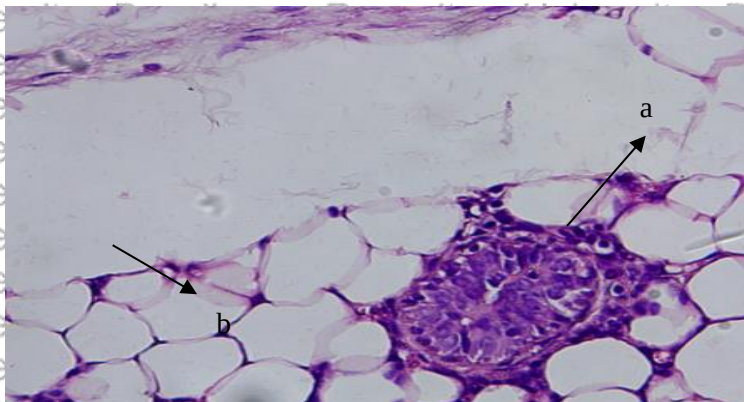
Hasil pengukuran dari *flow cytometry* dianalisis dengan *software* BD Cellquest Pro™ dan analisis statistik menggunakan SPSS 16.0

for Windows dengan uji *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *Duncan* ($\alpha=95\%$).

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Histopatologi Kanker Payudara

Pengamatan secara histopatologi dilakukan untuk mengkonfirmasi bahwa hewan coba yang digunakan benar-benar sudah mengalami kanker payudara. Berdasarkan hasil uji histologi dari kelenjar *mammæ* mencit dengan menggunakan pewarnaan HE (*Hematoxyline Eosin*) menunjukkan bahwa DMBA mampu menginduksi terbentuknya *ductal carcinoma in situ* (DCIS), tipe kanker payudara ini menunjukkan bahwa sel-sel kankernya masih berada di dalam duktus dan belum menyebar ke jaringan yang lain (Gambar 4). Jaringan payudara pada mencit yang terinduksi DMBA tidak didominasi oleh sel-sel epitel melainkan oleh sel-sel lemak (*adiposa*) yang berbentuk bulat dan berukuran besar.



(Dokumentasi Pribadi)

Gambar 4. Hasil histopatologi dengan pewarnaan HE pada jaringan payudara pasca induksi DMBA dengan perbesaran 400x. Keterangan: (a). Kanker payudara DCIS (b). Jaringan adiposa

Mirip dengan struktur payudara manusia, kelenjar *mammæ* tikus juga memiliki unit saluran lobular terminal (TDLU) dan terdiri dari saluran terminal dan lobulus. Meiyanto dkk., (2007) menjelaskan bahwa gambaran histologi jaringan payudara dari tikus yang dipapar oleh senyawa DMBA, kelenjar *mammæ* tikus terjadi proliferasi dari

epitel ke arah lumen, dengan ukuran epitel bervariasi. Massa tumor yang solid terlihat sebagai *lobulus* dari tumor sel yang dipisahkan oleh jaringan ikat. Pada tikus kanker payudara yang diberi senyawa DMBA ditemukan juga adanya proses peradangan/inflamasi yang kronik. Sel-sel tumor yang berproliferasi tersebut diamati merusak membran basal dan kemudian menyusup ke jaringan ikat, yang dikenal dengan IDC (*invasive ductal carcinoma*).

4.2 Jumlah Sel CD11b⁺

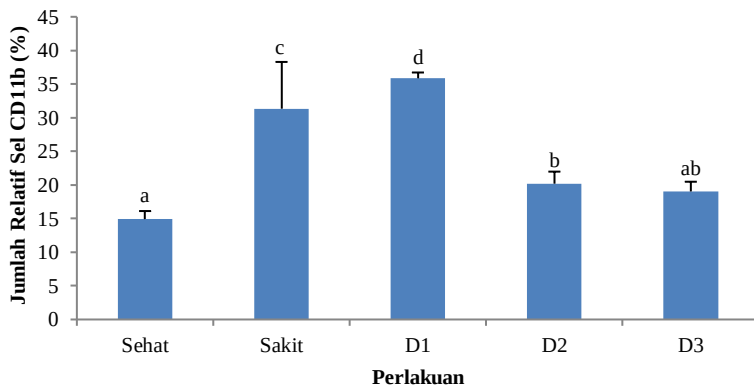
Hasil dari pemberian ekstrak kenikir mampu menurunkan jumlah sel CD11b⁺ terhadap mencit kanker payudara. Hal ini ditunjukkan dengan adanya perbedaan jumlah sel dari masing-masing perlakuan (Gambar 5). Persentase jumlah sel CD11b⁺ paling tinggi terjadi pada kelompok dosis 1 dan paling rendah terjadi pada kelompok sehat. Jumlah sel CD11b⁺ pada kelompok mencit yang sehat sebesar 14,93% sedangkan pada kelompok sakit dengan hanya pemberian DMBA mengalami peningkatan jumlah sel sebesar 31,34%. Pada kelompok perlakuan dosis 1 yang diberikan DMBA+ekstrak kenikir (50 mg/kg BB) mengalami peningkatan jumlah sel sebesar 35,86%. Penurunan jumlah sel CD11b⁺ pada kelompok ekstrak daun kenikir terjadi seiring dengan peningkatan dosis. Persentase jumlah sel pada dosis 2 dengan perlakuan DMBA+ekstrak kenikir (500 mg/kg BB) menjadi 26,19% dan dosis 3 pada kelompok perlakuan DMBA+ekstrak kenikir (2000 mg/kg BB) mengalami penurunan persentase sebesar 19,04%. Pada saat pemberian ekstrak kenikir terjadi penurunan jumlah sel, penurunan yang terjadi terlihat bahwa tidak berbeda signifikan antara dosis 2 dan dosis 3 (ditunjukkan dengan notasi ab pada Gambar 5).

Hasil persentase jumlah sel CD11b⁺ menunjukkan terjadinya peningkatan pada perlakuan induksi DMBA (sakit) jika dibandingkan dengan perlakuan normal. Pada perlakuan sakit, mencit mengalami kanker akibat produksi ROS yang meningkat sehingga menyebabkan terjadinya inflamasi. Peningkatan ROS terjadi akibat adanya ikatan antara senyawa aktif DMBA dengan sitokrom p-450 sehingga menyebabkan *aduksi* DNA dan memicu terjadinya proses detoksifikasi. Proses detoksifikasi yang disebabkan oleh senyawa karsinogenik DMBA mengakibatkan senyawa DMBA berubah menjadi DMBA3,4-diol, yang mana senyawa tersebut

merupakan representasi dari adanya radikal bebas (Gonzales & Shioko, 2001). ROS yang diproduksi dapat memicu aktivasi dari transkripsi NF- κ B yang berperan dalam regulasi gen-gen yang terlibat dalam respon imun dan inflamasi (Barnes, 1997; Caamano & Hunter, 2002).

Penurunan jumlah sel yang terjadi pada dosis 2 dan dosis 3, menunjukkan bahwa semakin besar dosis ekstrak kenikir yang diberikan pada mencit maka jumlah sel CD11b⁺ menurun. Penurunan juga didukung oleh aktivitas senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak kenikir yaitu flavonoid. Menurut Pebriana dkk., (2008) ekstrak metanolik dari daun kenikir memiliki kemampuan dalam memacu kematian sel kanker payudara T47D melalui mekanisme apoptosis. Sel kanker payudara T47D merupakan sel kanker yang dikultur dari jaringan payudara seorang wanita yang terkena ductal carcinoma. Mekanisme apoptosis dimulai dengan adanya kerusakan DNA dan peran protein p53. Protein p53 merupakan protein tumor supresor yang teraktivasi karena adanya kerusakan DNA atau adanya stress tertentu pada sel. Protein tersebut memacu proses apoptosis melalui peningkatan protein Bax. Protein Bax akan diaktifkan oleh protein Bcl-xl yang kemudian akan mengaktifkan sitokrom c yang dilepas dari mitokondria dan selanjutnya akan terjadi aktivitas berantai terhadap caspase 9 dan caspase 3 sehingga terjadi apoptosis.

Menurut Besung dkk., (2016) pada saat peradangan terjadi peningkatan jumlah makrofag. Peningkatan tersebut dikarenakan adanya migrasi makrofag dari peredaran darah ke daerah radang. Peningkatan jumlah makrofag juga disebabkan oleh percepatan proliferasi dan diferensiasi makrofag sehingga menyebabkan jumlah makrofag meningkat. Percepatan migrasi ini juga akibat adanya rangsangan IL-6 yang dihasilkan oleh sel makrofag. Makrofag merupakan sumber utama sitokin proinflamasi yang mendorong terjadinya *imunossurveillance* tumor (Burkholder dkk., 2014). Peningkatan jumlah *tumor associated macrophages* (TAMs) yang teramati pada jaringan kanker payudara berperan melindungi host terhadap kondisi sakit dan memfasilitasi lolosnya sel tumor dari sistem imun (Bhatelia & Singh, 2014). TAMs muncul dari monosit yang bermigrasi ke jaringan tumor dan berdiferensiasi menjadi makrofag.

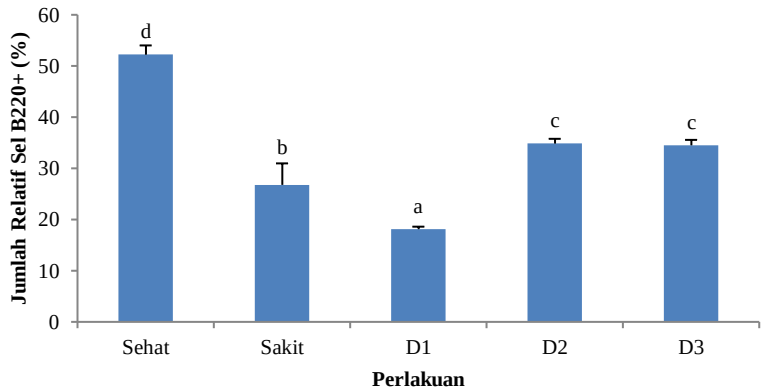


Gambar 5. Persentase jumlah sel CD11b⁺ yang pada kelompok perlakuan. Keterangan : Sehat (Normal); Sakit (DMBA); D1=500 mg/kg BB; D2=500 mg/kg BB; D3=2000 mg/kg BB

Makrofag memiliki reseptor permukaan yang mampu mengikat dan memfagositosis masuknya patogen. Hal tersebut menyebabkan terjadinya respon inflamasi dan aktivasi fagosit oleh neutrofil pada daerah yang terinfeksi. Migrasi neutrofil ke tempat infeksi dipengaruhi oleh sinyal kemotaktik yaitu KC/CXCL1, MIP-2/CXCL2/3 dan reseptor CXCR2 (Rifa'i, 2010).

4.3 Jumlah Sel B220⁺

Hasil dari pemberian ekstrak kenikir pada mencit kanker payudara memberikan efek yang beragam pada jumlah sel B220⁺ dari masing-masing kelompok perlakuan (Gambar 6). Efek pemberian ekstrak kenikir terhadap mencit kanker payudara mengalami perbedaan yang signifikan terhadap jumlah sel B220⁺ terlihat pada mencit kelompok perlakuan dosis 1 sebesar 18,13%, dosis 2 sebesar 20,19%, dan dosis 3 sebesar 19,04% jika dibandingkan dengan kelompok sehat dan sakit. Pada kelompok sehat jumlah sel B menunjukkan hasil yang tinggi yaitu sebesar 52,23%, sedangkan pada kelompok sakit dengan hanya pemberian DMBA jumlah sel B sebesar 26,77%. Berdasarkan hasil dari penelitian menunjukkan bahwa ada ketidakstabilan dalam perubahan jumlah sel B220⁺ karena pengaruh ekstrak kenikir.



Gambar 6. Persentase jumlah sel B220⁺ pada kelompok perlakuan. Keterangan : Sehat (Normal); Sakit (DMBA); D1=500 mg/kg BB; D2=500 mg/kg BB; D3=2000 mg/kg BB

Jumlah sel B pada kelompok sakit mengalami penurunan jika dibandingkan dengan kelompok sehat. Penelitian Hefni dkk. (2013) penurunan sel B220 terjadi akibat adanya proses migrasi sel B yang ada pada sumsum tulang menuju organ limfoid perifer sebagai proses homeostasis dalam mengatasi patogen. Adanya migrasi sel B yang menuju organ limfoid perifer dijelaskan oleh Cariappa dkk. (2007) bahwa progenitor sel B yang ada pada sumsum tulang berkembang menjadi sel B matang akibat adanya rangsangan dari antigen. Seiring dengan puncak kematangannya, sel B mengekspresikan molekul imunoglobulin M (IgM) atau *B Cell Receptor* (BCR) pada permukaan membrannya untuk kemudian meninggalkan sumsum tulang menuju organ limfoid perifer. Migrasi sel limfosit B pada organ limfoid perifer secara normal hanya berkisar antara 10-15% dari keseluruhan jumlah sel limfosit B pada sumsum tulang, namun pada kasus tertentu dapat mencapai 45%. Migrasi limfosit B pada jaringan limfoid perifer sebagai upaya adaptasi dan aktivasi sel B dalam merespons adanya antigen. Pada saat antigen masuk ke dalam tubuh maka sistem imun yang ada di dalam tubuh akan bereaksi dengan teraktivasinya sistem imun humoral.

Pada kelompok dosis 1 terjadi penurunan jumlah sel. Hal ini dapat dikarenakan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak

kenikir dapat menurunkan jumlah sel B yang berlebihan ketika dalam kondisi sakit kanker. Menurut Deng dkk. (2013) pengobatan dengan menggunakan senyawa dari tanaman salah satunya senyawa kuersetin diketahui dapat memperlambat proses proliferasi sel B pada kanker payudara dan mendorong apoptosis. Efek penghambatan kuersetin pada proliferasi sel kanker meningkat dengan meningkatnya konsentrasi obat yang diberikan dan lama waktu pengobatannya. Efek dari ekstrak kenikir dalam menurunkan jumlah sel B secara signifikan terjadi pada kelompok dosis 1 yang menunjukkan adanya mekanisme supresor yang terjadi disana. Asumsi yang dapat digunakan untuk menjelaskan kejadian ini adalah dalam dosis 50 mg/kg BB mencit merupakan dosis yang dapat memaksimalkan aktivitas dari molekul supresor untuk menurunkan jumlah sel B220⁺.

Meningkatnya jumlah sel B220⁺ pada kelompok perlakuan dosis 2 dan dosis 3 menunjukkan bahwa kandungan senyawa flavonoid yang terdapat dalam tanaman kenikir pada kisaran dosis yang diasumsikan dapat meningkatkan jumlah sel B220⁺. Semakin tinggi dosis ekstrak kenikir yang diberikan jumlah sel B menjadi meningkat. Menurut Parlinaningrum dkk. (2014) senyawa flavonoid yang terdapat pada tanaman dapat meningkatkan produksi sitokin dan meningkatkan proliferasi. Penambahan bahan yang bersifat imunostimulator dapat meningkatkan respon pada limfosit dan merangsang pembelahan sel sehingga terjadi proliferasi. Proliferasi limfosit akan mempengaruhi sel CD4, kemudian sel Th1 teraktivasi. Flavonoid juga dapat memicu proliferasi dan diferensiasi sel T dan sel B melalui produksi sitokin.

Sel B mempunyai sinyal reseptor yang berupa B220 (CD45). Proliferasi dan aktivasi sel limfosit B tidak terlepas dari peranan Sel T helper/sel Th (CD4) yang dapat membantu dalam mensekresikan sitokin. Sel Th dalam keadaan naïve (tidak teraktivasi dengan antigen) dilengkapi dengan molekul adhesi pada permukaannya yang berupa L-selektin (CD62L). Molekul L-selektin (CD62L) hilang dari permukaan sel Th seiring dengan adanya antigen atau agen inflamasi, dan sebagai responsnya sel Th akan mensekresikan sitokin yang dapat membantu terhadap proliferasi dan aktivasi sel limfosit B (Hefni dkk., 2013).

Salah satu faktor yang mempengaruhi aktivasi sel B adalah IL-2 yang diproduksi oleh CD4⁺. Ketika sel mengekspresikan jumlah

CD4⁺ yang tinggi, maka akan menunjukkan jumlah ekspresi sel B220⁺ yang rendah begitu sebaliknya ketika jumlah CD4⁺ rendah maka jumlah ekspresi sel B220⁺ tinggi. Hal ini diduga karena hanya sel B yang pada tahap akhir perkembangannya, yaitu sel B yang sudah berdiferensiasi menjadi sel plasma, mengalami penurunan ekspresi B220⁺ (*downregulated*). Dengan kata lain, B220⁺ adalah penanda untuk sel B naive. Sel B naive adalah sel B yang belum diaktifkan oleh keberadaan antigen. IL-2 yang dikeluarkan oleh CD4⁺ membantu aktivasi sel B, menghasilkan sekresi IL-2 yang lebih tinggi, maka ekspresi permukaan sel B220⁺ akan berkurang. Ini karena sel B yang diaktifkan akan mengalami penurunan ekspresi B220⁺ (Rachmawati, 2014).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini yaitu dengan pemberian ekstrak kenikir (*Cosmos caudatus*) selama 14 hari mampu menurunkan jumlah sel CD11b⁺ namun belum signifikan, sedangkan pada jumlah sel B220⁺ belum memberikan keefektifitasnya dalam menurunkan jumlah sel pada mencit kanker payudara.

5.2 Saran

Perlu dilakukan kajian lebih lanjut mengenai toksisitas dari ekstrak kenikir terhadap sistem organ lain pada mencit kanker payudara dan perlu adanya penambahan waktu terapi.

DAFTAR PUSTAKA

- Adawiyah, Robiatul., Arum Setiawan & Sri Nita. 2017. Pengaruh fraksi aktif dari ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus* kunth) terhadap uji sitotoksik, apoptosis dan antiproliferasi kanker payudara sel t47d secara in vitro. *Biomedical Journal of Indonesia: Jurnal Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya*. 3(3):138-144.
- Ahmad, Narmeen., Aula Ammar., Sarah J. Storr., Andrew R. Green., Emad Rakha., Ian O. Ellis & Stewart G. Martin. 2017. IL-6 and IL-10 are associated with good prognosis in early stage invasive breast cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 67:537-549.
- Alkabban, Fadi M. & Ferguson, Troy. 2019. **Cancer, breast**. Michigan State University.
- Allavena, Paola., Antonio Sica., Graziella Solinas., Chiara Porta & Alberto Mantovani. 2008. The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 66:1-9.
- Allred, DCraig. 2010. Ductal carcinoma in situ:terminology, classification and natural history. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 41.
- American Cancer Society. 2017. **Breast cancer facts & figures 2017-2018**. Atlanta. American Cancer Society, Inc.
- Anonius. 2011. *Cosmos caudatus* Kunth <https://florafaunaweb.nparks.gov.sg/special-pages/plant>. Diakses 15 Agustus 2018.
- Anonius. 2012. **Types of breast cancers histologic examples of in situ & invasive carcinomas of the breast**. <http://pathology.jhu.edu/breast/types.php>. Diakses 20 Mei 2018.
- Azwanida, NN. 2015. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med. Aromat Plant*. 4:196.
- Badriyah., J. Achmadi & L. K. Nuswantara. 2017. Kelarutan senyawa fenolik dan aktivitas antioksidan daun kelor

- (*Moringa oleifera*) di dalam rumen secara *in vitro*. *Jurnal Peternakan Indonesia*. 19(3):116 – 121.
- Bale, Cate. 2016. **Invasive versus metastatic breast cancer**. <http://healthandsymptoms.com/>. Diakses 20 Mei 2018.
- Besung, Nengah Kerta., Nyoman Mantik Astawa., Ketut Suata & Ni Ketut Suwiti. 2016. Hubungan antara aktivasi makrofag dengan kadar interleukin-6 dan antibodi terhadap salmonella typhi pada mencit. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 10(1):1-4.
- Bhatelia, K., K. singh. 2014. TLRs: Linking information and breast cancer. *Cellular Signaling*. 26:2350-2357.
- Bunawan, Hamidun., Syarul Nataqain Baharum., Siti Noraini Bunawan., Noriha Mat Amin & Normah Mohd Noor. 2014. *Cosmos caudatus* kunth: a traditional medicinal herb. *Global Journal of Pharmacology*. 8(3):420-426.
- Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC). 2014. Kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth) <http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/>. Diakses 18 Mei 2018.
- Cariappa A., Chase C., Liu H., Russell P & Pillai S. 2007. Naive recirculating B cells mature simultaneously in the spleen and bone marrow. *Journal Blood*. 109(6) :2339-2345.
- CCRC. 2008. Kanker mammae. http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/?page_id=885. Diakses 18 November 2019.
- Cheng, S.-H. 2015. Eight weeks of *Cosmos caudatus* (ulam raja) supplementation improves glycemic status in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. Evidence-based complementary and alternative medicine.
- Dalimarta, S. 2002. **Atlas tumbuhan Obat Indonesia (Jilid II) 134-138**. Yogyakarta. Pustaka Kartini.
- De Oliveira, Krishna Duro., Gabriela Uliana Avanzo., Marcello Vannucci Tedardi., Marcelo Monte Mór Rangel., Jose Luis Avanzo., Heidge Fukumasu., Kurapati Venkata Kesava Rao., Idercio Luiz Sinhorini & Maria Lúcia Zaidan Dagli. 2015. Chemical carcinogenesis by DMBA (7,12-dimethylbenzanthracene) in female BALB/c mice: new facts. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo. 52:125-133.
- Deng, Xiao-Hui., Hai-Yan Song., Ying-Feng Zhou., Guo-Yan Yuan & Feng-Jin Zheng. 2013. Effects of quercetin on the

- proliferation of breast cancer cells and expression of survivin *in vitro*. *Experimental And Therapeutic Medicine* 6:1155-1158.
- Dieci, M.V., G. grigulo, F. Miglietta & V. Guarneri. 2016. The immune system and hormone -receptor positive breast cancer: it's really a dead end?. *Cancer Treatment Review*. 46:9-19.
- Dunn, Gavin P., Lloyd J. Old & Robert D. Schreiber. 2004. Review the immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Journal Immunity*. 21:137-148.
- Feng, Man., Chang Feng., Zhigang Yu., Qinye Fu., Zhongbing Ma., Feng Wang., Fei Wang & Lixiang Yu. 2015. Histopathological alterations during breast carcinogenesis in a rat model induced by 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene and estrogen-progestogen combinations. *Int J Clin Exp Med*. 8(1):346-357.
- Figueroa, Jonine. 2016. New insights into the role of gender in breast cancer development https://blogs.biomedcentral.com/on_medicine/2016/02/10/new-insights-role-gender-breast-cancer-development/. Diakses 19 November 2019.
- Finn, O. J. 2012. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Annals Of Oncology*. 23: 86-89.
- Fu, Wen., Tom McCormick., Xiaoping Qi., Liping Luo., Lingyin Zhou., Xin Li1, Bing-Cheng Wang., Heidi E Gibbons., Fadi W Abdul-Karim & George I Gorodeski. 2009. Research article activation of p2x7-mediated apoptosis inhibits dmbs/tpa-induced formation of skin papillomas and cancer in mice. *BMC Cancer*. 9:114.
- Hanahan, D & Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100: 57-70.
- Hariana, H. Arief. 2008. **Tumbuhan Obat dan Khasiatnya seri 2**. Jakarta. Penebar Swadaya.
- Hariyadi, Purwiyatno. 2013. Freeze drying technology: for better quality & flavor of dried products. *FoodReview Indonesia*. 8(2):52-57.
- Hassan, W.W & Mahmood, M. 2007. **Healing herbs of Malaysia**. Biotropics Malaysia Berhad.

- Hefni, Mohammad., Muhaimin Rifa'i & Widodo. 2013. Aktivitas ekstrak daun kelor terhadap respons imun humoral pada mencit yang diinfeksi *Salmonella typhi*. *Jurnal Veteriner*. 14(4):519-526.
- Hondermarck, Hubert. 2003. Breast cancer: when proteomics challenges biological complexity (Review). *Molecular & Cellular Proteomics*. 281-291.
- Irianti, Tatang., Sylvia Utami Tujung Pratiwi., Kuswandi., Nanan Tresnaasih., Dharmastuti Cahya., Fatmarahmi & Yulia Paramitha. 2018. Aktivitas anti-tuberkulosis ekstrak etil asetat daun kenikir (*Cosmos caudatus* h.b.k) dan daun sendok (*Plantago major* L.) secara *in vitro*. *Traditional Medicine Journal*. 23(1):1-8.
- Jamnasi, Juli., Soehartati Gondhowiardjo., Zubairi DjoerbanM., Nurjati Chaerani Siregar., Evert DC Poetiray & Anna Puspita Tunggono. 2016. Faktor risiko terjadinya metastasis jauh pada pasien kanker payudara. *Radioterapi & Onkologi Indonesia*. 7(2):55-59.
- K. Narendra, J., Swathi K., M. Sowjanya A & Krishna Satya. 2012. *Phyllanthus niruri*: a review on its ethno botanical, phytochemical and pharmacological profile. *Journal of Pharmacy Research*. 5(9):4681-4691.
- Kementerian Kesehatan RI. 2015. Statistik penderita kanker di indonesia. <http://www.depkes.go.id/>. Diakses 19 Mei 2018.
- King, R. J. B. 2000. **Cancer biology second edition**. London. Person Education Limited.
- Kubatka, P., Ahlersova E., Ahlers I., Bojkova B., Kalicka K., Adamekova E., Markova M., Chamilova M & Cermakova M. 2002. Variability of mammary carcinogenesis induction in female sprague-dawley and wistar : han rats : the effect of season and age. *Physiol. Res*. 51:633-640.
- Lee LL, Lee JSC, Waldman SD, Casper RF & Grynpas MD. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons present in cigarette smoke cause bone loss in an ovariectomized rat model. 30: 917–923.
- Lestari, Sri Wahyu. 2012. **Efek anti tumor kombinasi rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa lamk*) dan meniran (*Phyllanthus niruri* L.) Terhadap sub populasi limfosit t**

- dan makrofag mencit bertumor mammae.** Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan.
- Li, Zhaoyang., Yanli Pang., Sudheer Kumar Gara., B.R. Achyut., Christopher Heger., Paul K. Goldsmith., Scott Lonning & Li Yang. 2012. Gr-1+CD11b+ cells are responsible for tumor promoting effect of TGF- β in breast cancer progression. *International Journal Cancer*. 131(11):2584–2595.
- Lotulung, P.D.N., Minarti & Kardono, L.B.S., 2005. **Penapisan aktivitas antibakteri, antioksidan dan toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* ekstrak tumbuhan Asteracea.** Pusat Penelitian Kimia LIPI.
- Maeda, Kenichiro., Alex Malykhin., Brittany N. Teague-Weber., Xiao-Hong Sun., A. Darise Farris & K. Mark Coggeshall. 2009. Interleukin-6 aborts lymphopoiesis and elevates production of myeloid cells in systemic lupus erythematosus-prone B6.Sle1.Yaa animals. *Journal Blood*. 113(19):4534–4540.
- Makki, Jaafar. 2015. Diversity of breast carcinoma: histological subtypes and clinical relevance. *Clinical Medicine Insights: Pathology*. (8): 23–31.
- Mangan, Yellia. 2009. **Solusi sehat mencegah dan mengatasi kanker.** Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Mediani, Ahmed., Faridah Abas., Alfi Khatib & Chin Ping Tan. 2013. *Cosmos caudatus* as a potential source of polyphenolic compounds: optimisation of oven drying conditions and characterisation of its functional properties. *Molecules*. 18: 10452-10464.
- Meiyanto, Edy., Sri Susilowati., Sri Tasminatun., Retno Murwanti & Sugiyanto. 2007. Efek kemopreventif ekstrak etanolik *Gynura procumbens* (Lour), Merr pada karsinogenesis kanker payudara tikus. *Majalah Farmasi Indonesia*. 18(3):154–161.
- Mishra, Rajbardhan., Jana Kovalska., Jozef Janda., Luca Vannucci., Radko Rajmon & Vratislav Horak. 2015. Tumor progression is associated with increasing Cd11b+ cells and ccl2 in lewis rat sarcoma. *Anticancer Research*. 35:703-712.
- Mohamed, Norazlina., Zulaikha Sahhugi., Elvy Suhana Mohd Ramli & Norliza Muhammad. 2013. The effects of *Cosmos*

- caudatus* (ulam raja) on dynamic and cellular bone histomorphometry in ovariectomized rats. *BMC Research Notes*. 6:239.
- Mohan, H. 2010. **TextBook of Pathology: Sixth Edition**. Jaypee Brothers Medical Publisher. New Delhi.
- Moshawih, Said., Manraj Singh Cheema., Zuraini Ahmad., Zainul Amiruddin Zakaria & Muhammad Nazrul Hakim. 2017. A Comprehensive Review on *Cosmos caudatus* (ulam raja): pharmacology, ethnopharmacology, and phytochemistry. *International Research Journal of Education and Sciences (IRJES)*. 1(1):14 – 31.
- Murphy, Kenneth. 2012. **Janeway's immunobiology**. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. New York.
- Nani, Desiyani. 2009. Analisis faktor-faktor yang berhubungan dengan kejadian kanker payudara di rumah sakit pertamina cilacap. *Jurnal Keperawatan Soedirman (The Soedirman Journal of Nursing)*. 4(2):61-66.
- National cancer Institute. 2018. **Cancer Statistics**. <https://www.cancer.gov/aboutcancer/understanding/statistics>. Diakses 19 Mei 2018.
- Oka, S., N. Mori., S. Matsuyama., Y. Takamori & K. Kubo. 2000. Presence of B220 within thymocytes and its expression on the cell surface during apoptosis. *Immunology*. 100: 417-423.
- Pandya, Pankita H., Mary E. Murray., Karen E. Pollok & Jamie L. Renbarger. 2016. Review article the immune system in cancer pathogenesis: potential therapeutic approaches. *Journal of Immunology Research*. 2016. ID 4273943: 13.
- Park, Jun Su., Doo Ho Choi., Seung Jae Huh., Won Park., Young Il Kim., Seok Jin Nam., Jeong Eon Lee & Won Ho Kil. 2015. Comparison of clinicopathological features and treatment results between invasive lobular carcinoma and ductal carcinoma of the breast. *J Breast Cancer*. 18(3): 285-290.
- Patel, S., & Gogna, P. 2015. Tapping botanicals for essential oils: Progress and hurdles in cancer mitigation. *Industrial Crops and Products*. 76:1148-1163.
- Pebriana, RB., Wardhani, BWK., Widayanti, E., Wijayanti, NLS., Wijayanti, TR., Riyanto, S & Meiyanto, E., 2008. Pengaruh ekstrak metanolik daun kenikir (*Cosmos caudatus* kunth.)

- terhadap pemacuan apoptosis sel kanker payudara. *Pharmacon*. 9(1): 21-26.
- Peter, Abdelmessieh. 2016. Breast cancer histology ductal carcinoma in situ. <https://emedicine.medscape.com/>. Diakses 21 Mei 2018.
- Rachmawati, Indriya & Rifa'i, Muhaimin. 2014. *In vitro* immunomodulatory activity of aqueous extract of *Moringa oleifera* Lam. leaf to the CD4⁺, CD8⁺ and B220⁺ cells in *Mus musculus*. *J.Exp. Life Sci*. 4(1):15-20.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L & Zhang, L. 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*. 23(4):519-534.
- Rosenberger, C.M., G.M. Scott, R.M.R. Gold, R.E.W. Hancock & B.B. Finlay. 2000. *Salmonella typhimurium* infection and lipopolysaccharide stimulation induce similar changes in macrophage gene expression. *J. Immunol*. 164:5894-5904.
- Ruddon, R.W. 2007. **Cancer Biology**. 4th Edition. Oxford University Press. Oxford
- Rundle, A., Tang D., Hibshoosh H., Estabrook A., Schanabel F., Cao W., Grumet S & Perera F. 2000. The relationship between genetic damage from polycyclic aromatic hydrocarbons in breast tissue and breast cancer. *Carcinogenesis*. 2(7):1281-1289.
- Salima, Siti., Supriadi Gandamihardja & Ali Budi Harsono. 2016. Korelasi antara ekspresi tumor infiltrating lymphocytes CD4 dan CD8 dengan kanker ovarium tipe epitel stadium lanjut yang bebas penyakit dan kekambuhan. *Indonesian Journal of Cancer*. 10(2):43-47.
- Schafer, J.M., Lee, E.S., O'Regan, R.M., Yao, K & Jordan, V.C. 2000. Rapid development of tamoxifen-stimulated mutant p53 breast tumors (T47D) in athymic mice. *Clinical Cancer Research*. 6:4373-4380.
- Schafer, Zachary T & Brugge, Joan S. 2007. IL-6 involvement in epithelial cancers. *The Journal of Clinical Investigation*. 117:3660-3663.
- Scheller Jürgen., Athena Chalaris., Dirk Schmidt-Arras & Stefan Rose-John. 2011. The pro- and anti-inflammatory properties

- of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1813: 878–888.
- Sukri, Nur Ain Binti. 2012. **A thesis: effect of different types of solvent on extraction of phenolic compounds from *Cosmos caudatus***. Universiti Malaysia Pahang.
- Suzanne Ostrand & Rosenberg. 2008. Immune surveillance: a balance between pro- and anti-tumor immunity. *Curr Opin Genet Dev*. 18(1):11–18.
- Tambunan. 2003. **Diagnosis dan tatalaksana sepuluh jenis kanker di indonesia**. EGC. Jakarta.
- Taraphdar, Amit K., Madhumita Roy & Bhattacharya R.K. 2001. Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. *Current Science*. 80(11):1391.
- Tobian, A.A., N.S. Potter, L. Ramachandra, R.K. Pai, M. Convery, W.H. Boom & C.V. Harding. 2003. Alternate class I MHC antigen processing is inhibited by toll-like receptor signaling pathogen-associated molecular patterns: *Mycobacterium tuberculosis* 19-kDa lipoprotein, CpG DNA, and lipopolysaccharide. *J. Immunol*. 171(3):1413-1422.
- Varga, Georg., Sandra Balkow., Martin K. Wild., Andrea Stadtbaeumer., Mathias Krummen., Tobias Rothoeft., Tetsuya Higuchi., Stefan Beissert., Klaus Wethmar., Karin Scharffetter-Kochanek., Dietmar Vestweber & Stephan Grabbe. 2007. Active MAC-1 (CD11b/CD18) on DCs inhibits full T-cell activation. *Journal Blood*. 109(2):661-669.
- Vatovec, Christine M., Mujde Z. Erten., Jane Kolodinsky., Phil Brown., Marie Wood., Ted James & Brian L. Sprague. 2014. Ductal carcinoma in situ: a brief review of treatment variation and impacts on patients and society. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 24(4):281–286.
- Vela'zquez, Marcela Esquivel., Pedro Ostoa-Saloma., Margarita Isabel Palacios-Arreola., Karen E. Nava-Castro., Julieta Ivonne Castro & Jorge Morales-Montor. 2015. The role of cytokines in breast cancer development and progression. *Journal Of Interferon & Cytokine Research*. 35(1).

- Wahyuni, Wulan Tri., Latifah K. Darusman Pitria dan Aprilani Rahmat. 2018. Analisis kadar flavonoid dan antioksidan ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*), rumput mutiara (*Oldenlandia corymbosa*), dan sirsak (*Annona muricata*) dengan teknik spektrometri. *Analit: Analytical and Environmental Chemistry*. 3(1):38-46.
- Yanuartono., H. Purnamaningsih., A. Nururrozi & S. Indarjulianto . 2017. Saponin : dampak terhadap ternak (ulasan). *Jurnal Peternakan Sriwijaya*. 6(2):79-90.
- Yudissanta, Arief & Ratna, Madu. 2012. Analisis pemakaian kemoterapi pada kasus kanker payudara dengan menggunakan metode regresi logistik multinomial (studi kasus pasien di rumah sakit “x” surabaya). *Jurnal Sains Dan Seni ITS*. 1(1):112-117.
- Zhao, Tiejun., Qiang Sun., Maud Marques & Michael Witcher. 2015. Review articel anticancer properties of *Phyllanthus emblica* (indian gooseberry). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 7 hlm.