

**PENGARUH EKSTRAK TAPAK LIMAN (*Elephantopus scaber*) PADA AKTIVASI  
SEL-SEL IMUNOKOMPETEN DAN PERUBAHAN SITOKIN PROINFLAMASI  
PADA MENCIT MODEL KANKER YANG DIINDUKSI DMBA DAN HORMON  
ESTROGEN**

**TESIS**

oleh

**LAILIYAVINA ROCHMATIKA**

**166090100111014**



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI**

**JURUSAN BIOLOGI**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2019**

**PENGARUH EKSTRAK TAPAK LIMAN (*Elephantopus scaber*) PADA AKTIVASI  
SEL-SEL IMUNOKOMPETEN DAN PERUBAHAN SITOKIN PROINFLAMASI  
PADA MENCIT MODEL KANKER YANG DIINDUKSI DMBA DAN HORMON  
ESTROGEN**

**TESIS**

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

oleh  
**Lailiyavina Rochmatika**

**166090100111014**



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI**

**JURUSAN BIOLOGI**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

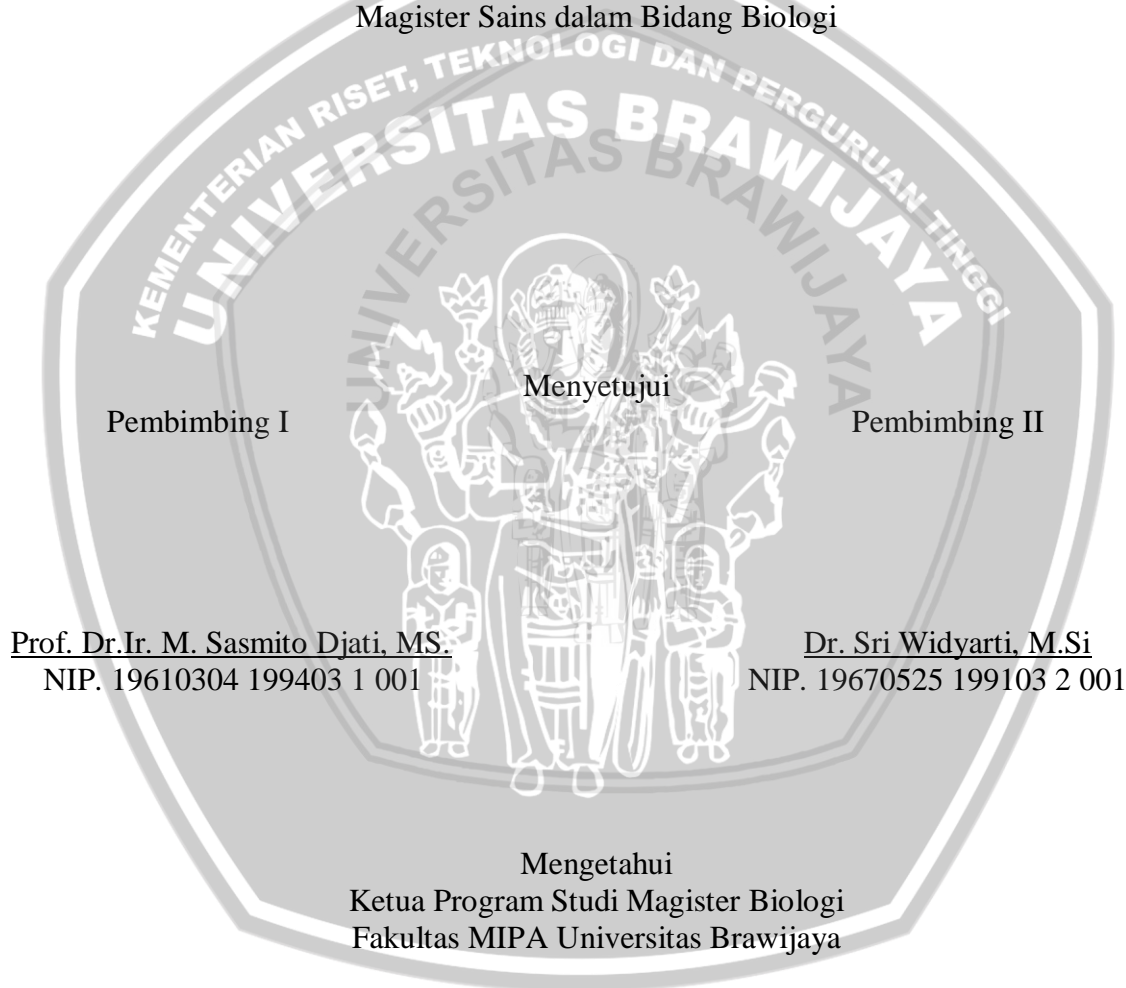
**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2019**

**HALAMAN PENGESAHAN TESIS****PENGARUH EKSTRAK TAPAK LIMAN (*Elephantopus scaber*) PADA AKTIVASI SEL-SEL IMUNOKOMPETEN DAN PERUBAHAN SITOKIN PROINFLAMASI PADA MENCIT MODEL KANKER YANG DIINDUKSI DMBA DAN HORMON ESTROGEN****LAILIYAVINA ROCHMATIKA**  
**166090100111014**

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 26 Juli 2019  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Magister Sains dalam Bidang Biologi



Nia Kurniawan, S.Si., MP., D.Sc  
NIP. 19671213 199103 2 001

**SUSUNAN KOMISI PEMBIMBING DAN PENGUJI TESIS**

Judul Tesis:

**PENGARUH EKSTRAK TAPAK LIMAN (*Elephantopus scaber*) PADA AKTIVASI SEL-SEL IMUNOKOMPETEN DAN PERUBAHAN SITOKIN PROINFLAMASI PADA MENCIT MODEL KANKER YANG DIINDUKSI DMBA DAN HORMON ESTROGEN**

Nama : Lailiyavina Rochmatika

NIM : 1660901000111014

**KOMISI PEMBIMBING :**

Ketua : Prof. Dr. Ir. M. Sasmito Djati, MS.

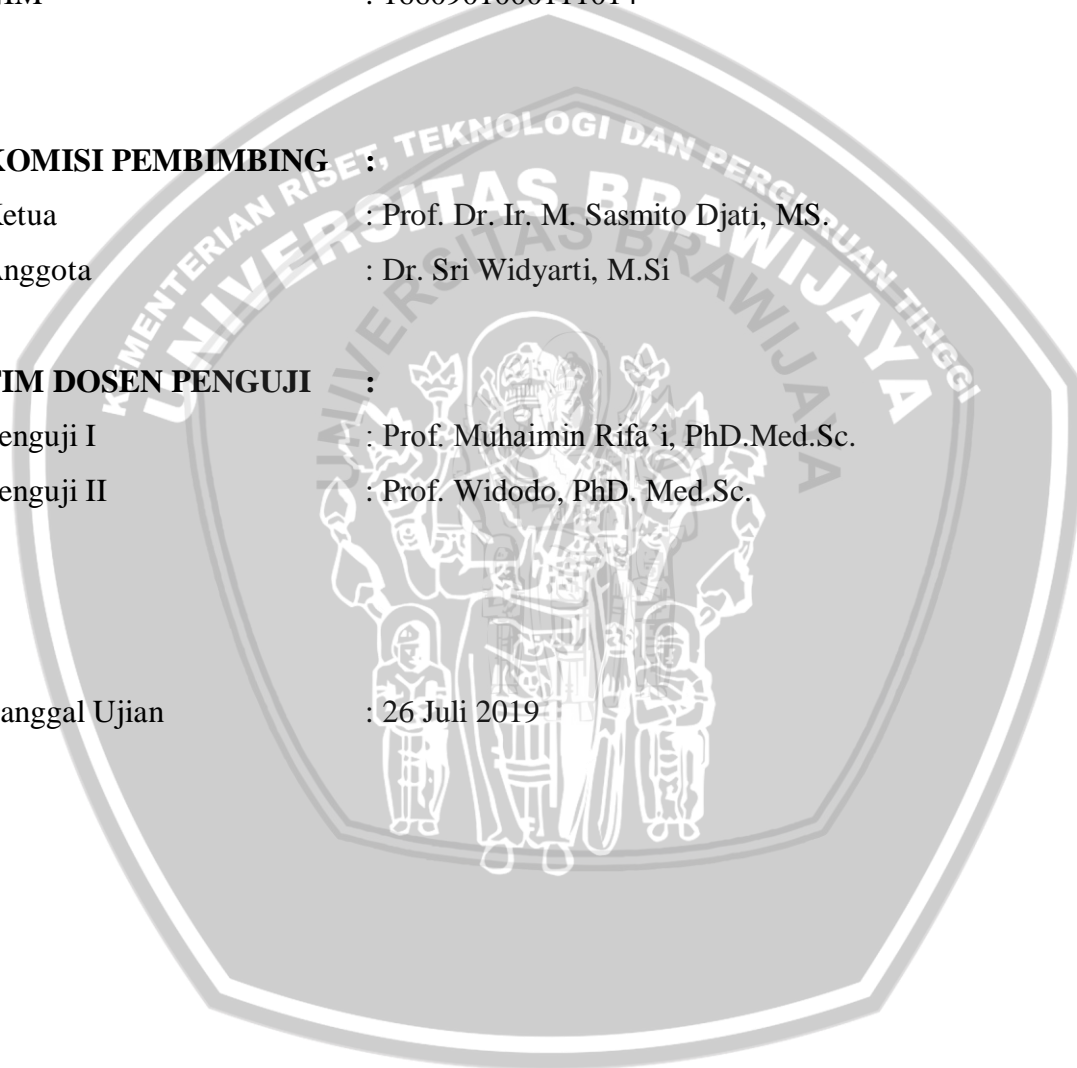
Anggota : Dr. Sri Widyarti, M.Si

**TIM DOSEN PENGUJI :**

Penguji I : Prof. Muhaimin Rifa'i, PhD.Med.Sc.

Penguji II : Prof. Widodo, PhD. Med.Sc.

Tanggal Ujian : 26 Juli 2019



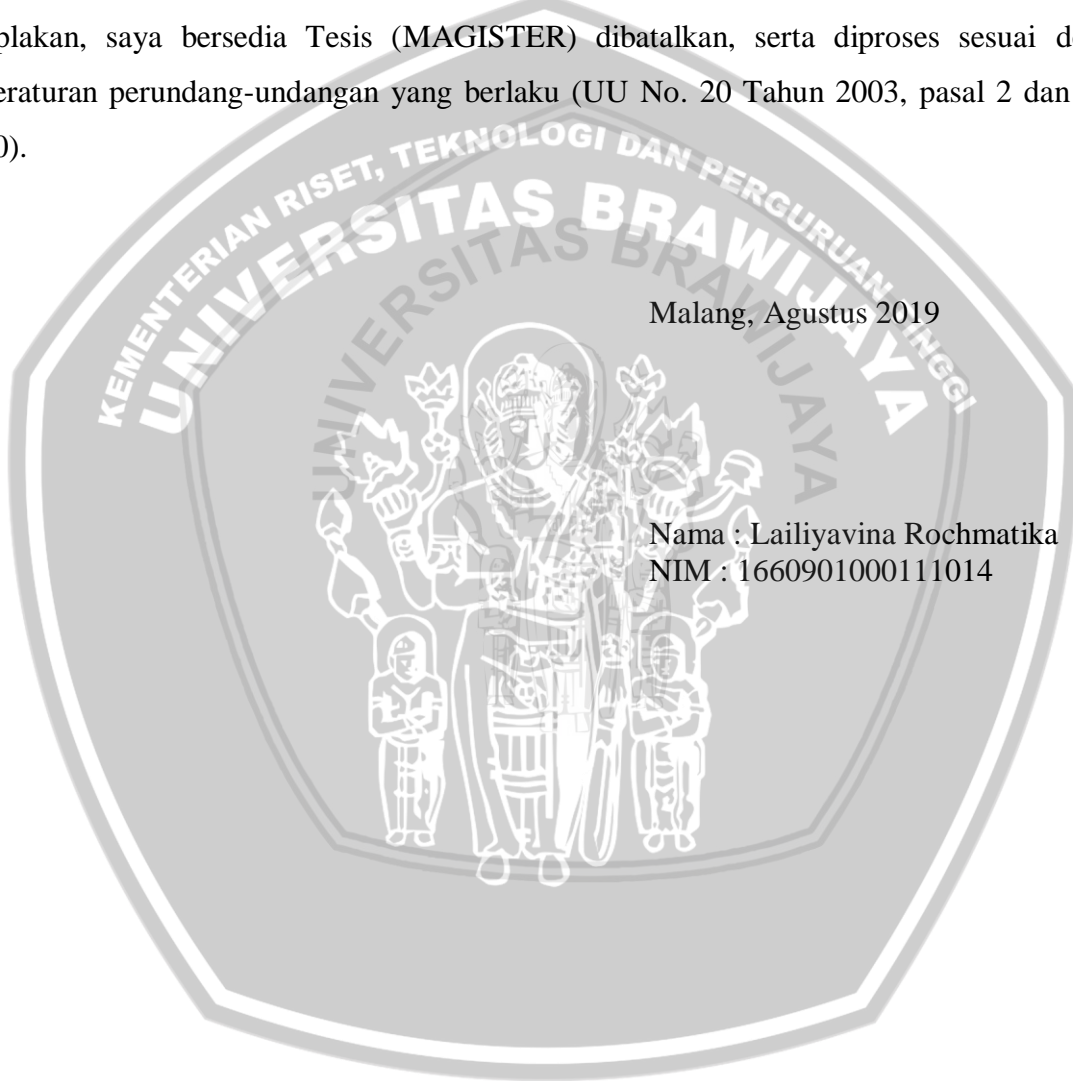
## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah Tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam Naskah Tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur jiplakan, saya bersedia Tesis (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 2 dan pasal 70).

Malang, Agustus 2019

Nama : Lailiyavina Rochmatika  
NIM : 1660901000111014

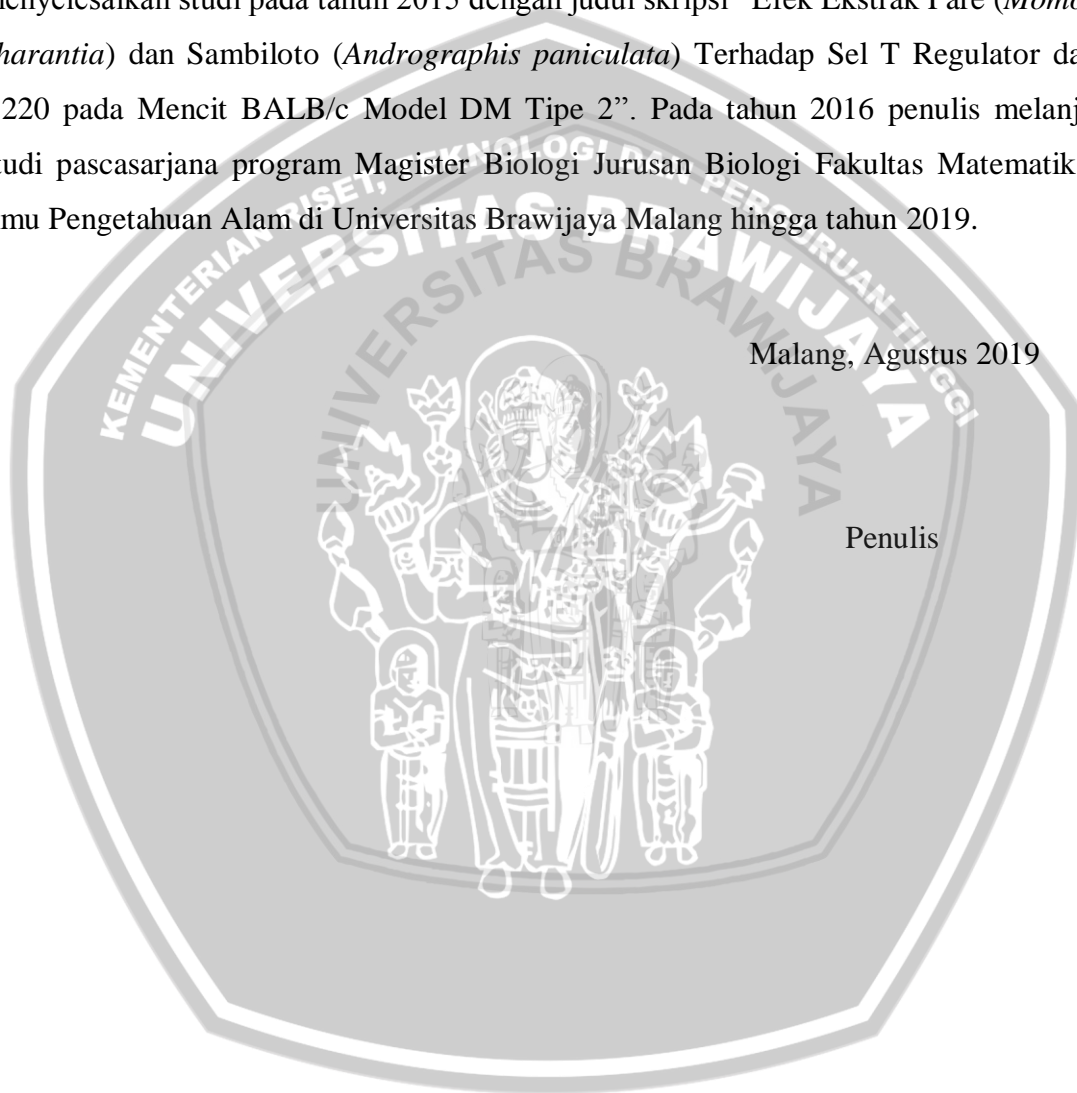


## RIWAYAT HIDUP

Lailiyavina Rochmatika, Malang, 02 September 1992, putri dari Bapak Abu Shofyan dan Ibu Mufidah. Pendidikan dasar ditempuh di SD Girimoyo 01 Karangploso Malang, pendidikan SMP ditempuh di SMPN 1 Karangploso, dan pendidikan SMA ditempuh di SMAN 1 Batu. Lulus SMA pada tahun 2011 kemudian melanjutkan studi di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya dan menyelesaikan studi pada tahun 2015 dengan judul skripsi “Efek Ekstrak Pare (*Momordica charantia*) dan Sambiloto (*Andrographis paniculata*) Terhadap Sel T Regulator dan Sel B220 pada Mencit BALB/c Model DM Tipe 2”. Pada tahun 2016 penulis melanjutkan studi pascasarjana program Magister Biologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam di Universitas Brawijaya Malang hingga tahun 2019.

Malang, Agustus 2019

Penulis



## PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

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



## RINGKASAN

**Pengaruh Ekstrak Tapak Liman (*Elephantopus scaber*) pada Aktivasi Sel-Sel Imunokompeten dan Perubahan Sitokin Proinflamasi pada Mencit Model Kanker Yang Diinduksi DMBA dan Hormon Esterogen**

Lailiyavina Rochmatika, Muhammad Sasmito Djati, Sri Widyarti  
Program Magister Biologi, Jurusan Biologi,  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya 2019

Senyawa karsinogen seperti DMBA menyebabkan terjadinya kerusakan DNA yang berpengaruh pada gen-gen pengatur pertumbuhan sehingga akan terjadi pertumbuhan yang tidak terkontrol. Hal tersebut dapat menyebabkan perubahan pada sistem imunitas tubuh karena adanya respon untuk mengendalikan sel abnormal. Ekstrak Tapak Liman digunakan dalam penanganan alternatif penyakit kanker karena dapat mempengaruhi kerja dari sistem imunitas tubuh. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh dari ekstrak Tapak Liman terhadap perubahan kuantitatif sel T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> dan sitokin proinflamasi CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> dan CD4<sup>+</sup> TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>. Eksperimen in vivo dilakukan dengan menggunakan mencit betina galur BALB/c berumur 5-6 minggu. Serbuk daun *E. scaber* diperoleh dari Material Medika Batu, Malang. Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (mencit sehat), kontrol positif (mencit kanker induksi DMBA dan Estradiol), kelompok perlakuan pemberian ekstrak Tapak liman selama 1 minggu (minggu ke-10), kelompok perlakuan pemberian ekstrak Tapak liman selama 2 minggu (minggu ke-11) dan kelompok perlakuan pemberian ekstrak Tapak liman selama 3 minggu (minggu ke-12). Induksi kanker dilakukan dengan menginjeksi DMBA (7,12 dimethylbenz ( $\alpha$ ) antrasen) dosis 0,56 mg/kg BB dan injeksi hormon estradiol 0,0504 mg/kg BB secara subkutan. Ekstrak *E.scaber* yang diberikan yaitu dosis 50 mg/kg BB setiap hari selama 1, 2, dan 3 minggu. Limfosit diisolasi pada organ *spleen* dan dilihat profil sel T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> dan sitokin proinflamasi CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> dan CD4<sup>+</sup> TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> melalui analisis *flow cytometry*. Data dianalisis menggunakan ANOVA ( $p < 0,05$ ) Rancangan Acak Kelompok dan analisis dilakukan dengan menggunakan program SPSS 16 for Windows, serta dilakukan analisis *path*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa induksi senyawa karsinogen DMBA dan Estradiol pada mencit berpengaruh pada kerontokan bulu mencit. Induksi senyawa karsinogen DMBA dan Estradiol pada mencit berpengaruh pada penurunan sistem imun sel T CD4 minggu ke-10 sebesar 17,34%, minggu ke-11 10,55% dan 4,34% pada minggu ke-12, serta pada CD8 sebesar 9,76% pada minggu ke-11 dan 8,50% pada minggu ke-12. Serta induksi senyawa karsinogen DMBA dan estradiol telah menurunkan jumlah sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>. Selain itu, Induksi DMBA dan estradiol mampu meningkatkan jumlah sitokin proinflamasi CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> pada minggu ke-10 sebesar 5,99% dan meningkatkan jumlah CD4<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> sebesar 3,06%. Selain itu juga menurunkan jumlah CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> pada minggu ke-11 sebesar 1,13% serta minggu ke-12 sebesar 2,20%. Pemberian ekstrak *E. scaber* mampu meningkatkan jumlah sitokin proinflamasi TNF- $\alpha$  sebesar 5,81%. Adanya pemberian ekstrak *E. scaber* mampu meningkatkan jumlah CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> pada minggu ke-10 sebesar 15,16% dan ke-11 sebesar 12,35%.



## SUMMARY

### ACTIVITY ANALYSIS of *Elephantopus scaber* LEAVES EXTRACT AGAINST QUANTITATIVE CHANGES OF LYMPHOCYTES IN BALB/c Mice BREAST CANCER MODEL INDUCED BY DMBA AND ESTROGEN

Lailiyavina Rochmatika, Muhammad Sasmito Djati, Sri Widyarti  
Program Magister Biologi, Jurusan Biologi,  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya 2019

Carcinogenic compounds such as DMBA cause DNA damage that affects growth regulator genes so that uncontrolled growth will occur. This can cause changes in the body's immune system because of the response to controlling abnormal cells. Tapak Liman extract is used in handling alternative cancer because it can affect the work of the body's immune system. The aim of this study was to determine the effect of *E. scaber* extract on quantitative changes in CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> T cells and proinflammatory cytokines CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>. In vivo experiments were carried out using 5-6 weeks BALB/c strain female mice. Extract of Tapak Liman leaf powder was obtained from Material Medica Batu, Malang. The experimental animals were divided into five groups: negative control group (healthy group), positive control (cancer induce DMBA and Estradiol), giving extract for 1 week (Week 10), giving extract for 2 weeks (Week 11), and giving extract for 3 weeks (Week 12). Cancer induction have done by DMBA injection (7.12 dimethylbenz ( $\alpha$ ) anthracene) dose of 0.56 mg/kg BB and injection of the hormone estradiol 0.0504 mg/kg BB by subcutan. Extract of *E.scaber* is given, which is a dose of 50 mg/kg body weight every day for 1, 2, and 3 weeks. Lymphocytes were isolated in spleen organs and viewed CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> T cells and proinflammatory cytokines CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> T cells through analysis of flow cytometry. Data were analyzed using One-way ANOVA ( $p < 0.05$ ) and SPSS 16 for Windows. The results showed that the induction of DMBA and Estradiol carcinogens in mice had an effect on the loss of mice fur. The induction of DMBA and Estradiol carcinogens in mice has an effect on decreasing the immune system of CD4 17,34% at week 10, 10,55% at week 11, and 4,34% at week 12, and CD8 T cells 9,76% at week 11 and 8,50% at week 12. As well as the induction of DMBA carcinogen compounds and estradiol has reduced the number of CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> cells. In addition, DMBA and estradiol induction was able to increase the number of proinflammatory cytokines of CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 5,99% at week 10 and increase the number of CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 3,06%. As well as DMBA and estradiol can decrease the number of CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 1,13% at week 11 and 2,20% at week 12. Whereas *E. scaber* extract can increase the number of proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  5,81%. The presence of *E. scaber* extract can increase the number of CD4 + IFN- $\gamma$  + at the week 10 15,16% and week 11 12,35%.

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT karena atas rahmat dan hidayahNya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Tapak Liman (*Elephantopus scaber*) pada Aktivasi Sel-Sel Imunokompeten dan Perubahan Sitokin Proinflamasi pada Mencit Model Kanker Yang Diinduksi DMBA dan Hormon Esterogen”. Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Allah SWT dan Nabi Muhammad SAW yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya;
2. Bapak Prof. Dr. Ir. M. Sasmito Djati, MS. selaku pembimbing 1 dan Ibu Sri Widyarti, M.Si selaku dosen pembimbing II yang telah membimbing dalam penyelesaian tesis ini;
3. Bapak Prof. Muhaimin Rifa'i, Prof Widodo, Bu Dr. Sri Rahayu, M. Kes, Bapak Sofy Permana, MSc. Dsc selaku penguji yang telah memberikan saran, ilmu, dan motivasinya;
4. Keluarga besar yang telah memberikan dukungan moril dan materil;
5. Tria, Firda, Manda, Yola, Niken yang selalu memberikan semangat dan dukungan serta Magister Biologi angkatan 2016;
6. Teman-teman satu tim dan anggota Laboratorium Anatomi dan Fisiologi Hewan Universitas Brawijaya yang telah membantu dalam penelitian dan memberikan saran teknis selama pengerjaan;
7. Rizki Amalia, Yustika Aulia Rahma, Diandra Dewi, dan Lasria Yoseva sebagai partner penelitian yang sudah membantu;
8. Fitri, Rizka Funtris, Fika Aghalia Khairunnisa, dan Fatkhur Rohman yang telah membantu dalam penyelesaian tesis ini;
9. Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan yang telah membiayai pendidikan saya;
10. Serta semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian tesis ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih memiliki kekurangan. Saran, masukan, maupun kritik dari pembaca sangat diharapkan agar pada penulisan karya-karya berikutnya dapat menjadi lebih baik. Penulis berharap agar skripsi ini dapat bermanfaat bagi para pembaca.

Malang, Agustus 2019

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>RINGKASAN</b> .....	ii
<b>SUMMARY</b> .....	iii
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	iv
<b>DAFTAR ISI</b> .....	v
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	vii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	viii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	ix
<b>DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN</b> .....	x
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar belakang .....	1
1.2 Rumusan masalah .....	3
1.3 Tujuan .....	3
1.4 Manfaat .....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
2.1 Sistem Imunitas Tubuh dalam Kanker .....	4
2.2 Kanker Payudara .....	8
2.3 Senyawa Penginduksi Kanker .....	9
2.4 <i>Elephantopus scaber</i> .....	10
2.5 <i>Flow Cytometry</i> .....	11
2.6 Kerangka Konsep .....	13
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b> .....	15
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	15
3.2 Kerangka Operasional .....	15
3.3 Langkah Penelitian .....	16
3.3.1 Pembuatan Ekstrak Tapak Liman ( <i>Elephantopus scaber</i> ) .....	16
3.3.2 Persiapan Hewan Coba .....	16
3.3.3 Deskripsi Perlakuan dan Rancangan Percobaan .....	16
3.3.4 Induksi Kanker Payudara pada Mencit BALB/c .....	17
3.3.5 Pemberian Ekstrak <i>E. scaber</i> pada Mencit BALB/c .....	17
3.3.6 Pengamatan Mencit Pasca Induksi Kanker .....	18
3.3.7 Pengamatan Hewan Coba .....	18
3.3.8 Isolasi Limfosit dari Organ <i>Spleen</i> .....	18
3.3.9 Preparasi dan Analisis <i>Flow Cytometry</i> .....	18
3.3.10 Analisis Data .....	19
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	20
4.1 Pengaruh Induksi senyawa karsinogen (DMBA dan hormon estrogen) terhadap kondisi klinis mencit .....	20
4.2 Analisis perubahan profil jumlah total sel T CD4 <sup>+</sup> dan CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> pada kelompok mencit normal, mencit kanker induksi senyawa DMBA dan estradiol, serta pemberian ekstrak <i>E.scaber</i> .....	25



4.3	Analisis perubahan profil jumlah total sel T CD8 <sup>+</sup> dan CD8 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> pada kelompok mencit normal, mencit kanker induksi senyawa DMBA dan estradiol, serta pemberian ekstrak <i>E.scaber</i> .....	29
4.4	Analisis perubahan profil jumlah total sel T CD4 <sup>+</sup> TNF-α <sup>+</sup> pada kelompok mencit normal, mencit kanker induksi senyawa DMBA dan estradiol, serta pemberian ekstrak <i>Elephantopus scaber</i> .....	34
4.5	Analisis perubahan profil jumlah total sel T CD4 <sup>+</sup> IFNγ <sup>+</sup> pada kelompok mencit normal, mencit kanker induksi senyawa DMBA dan estradiol, serta pemberian ekstrak <i>Elephantopus scaber</i> .....	35
4.6	Pengaruh Induksi Senyawa Karsinogen (DMBA dan Estradiol) dan Pemberian Ekstrak <i>Elephantopus scaber</i> terhadap fluktuasi CD4, CD4CD62L, CD8, CD8CD62L, TNF-α, dan IFN-γ .....	38
<b>BAB V PENUTUP</b> .....		42
5.1	Kesimpulan .....	42
5.2	Saran .....	42
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....		43
<b>LAMPIRAN</b> .....		48



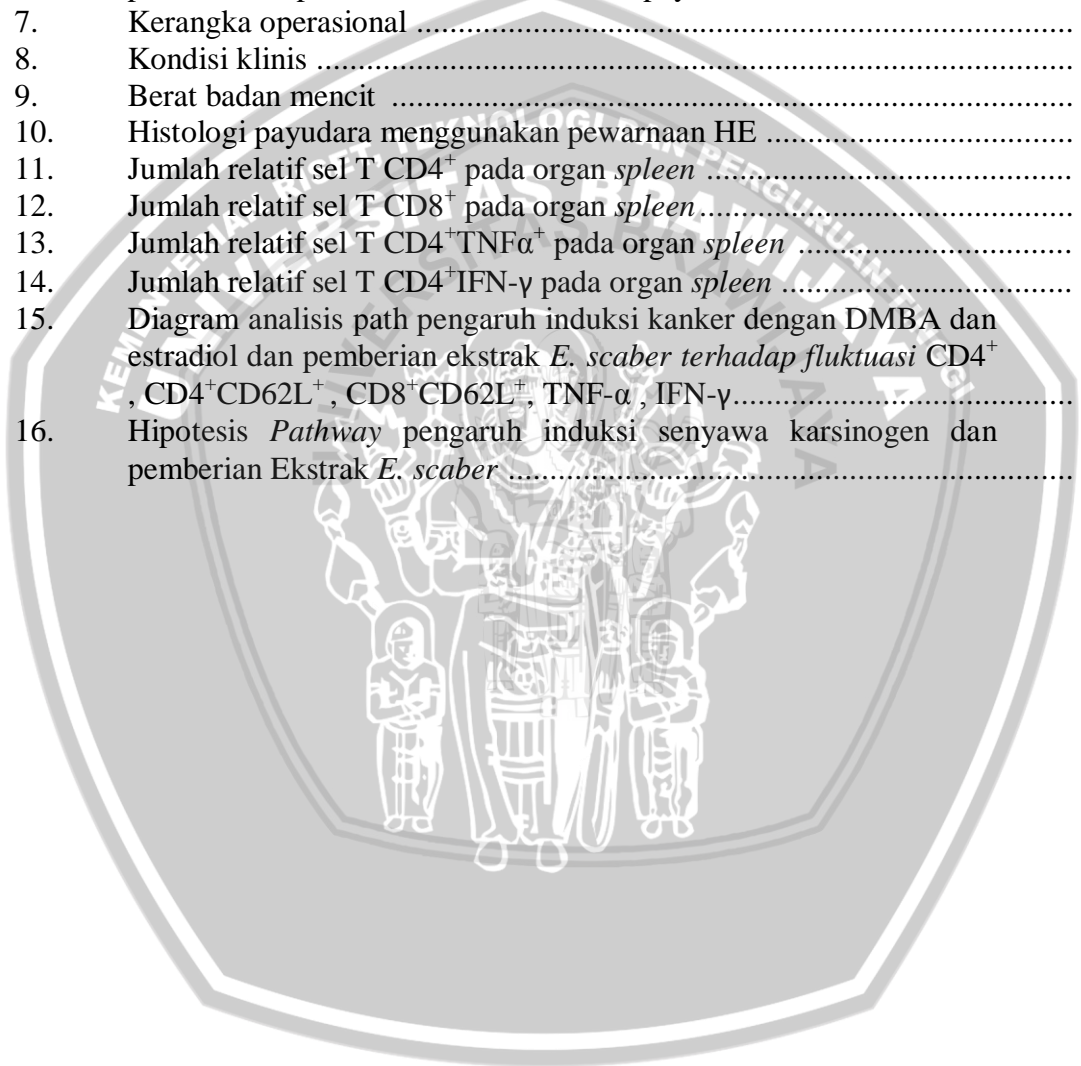
## DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1.	Kelompok perlakuan .....	17
2.	Pengamatan kondisi klinis Tubuh Mencit.....	21



## DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1.	Respon imunitas tubuh .....	4
2.	Perkembangan sel CD4 <sup>+</sup> dan CD8 <sup>+</sup> .....	6
3.	Pengaruh kanker terhadap sistem imunitas tubuh .....	8
4.	Bagian dari tumbuhan <i>E. scaber</i> .....	11
5.	Prinsip kerja <i>flowcytometry</i> .....	12
6.	Kerangka konsep penelitian pengaruh ekstrak tapak liman dalam mengaktifkan sel-sel imunokompeten dan perubahan sitokin proinflamasi pada mencit model kanker payudara .....	13
7.	Kerangka operasional .....	15
8.	Kondisi klinis .....	20
9.	Berat badan mencit .....	23
10.	Histologi payudara menggunakan pewarnaan HE .....	24
11.	Jumlah relatif sel T CD4 <sup>+</sup> pada organ <i>spleen</i> .....	26
12.	Jumlah relatif sel T CD8 <sup>+</sup> pada organ <i>spleen</i> .....	32
13.	Jumlah relatif sel T CD4 <sup>+</sup> TNFα <sup>+</sup> pada organ <i>spleen</i> .....	35
14.	Jumlah relatif sel T CD4 <sup>+</sup> IFN-γ pada organ <i>spleen</i> .....	36
15.	Diagram analisis path pengaruh induksi kanker dengan DMBA dan estradiol dan pemberian ekstrak <i>E. scaber</i> terhadap fluktuasi CD4 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> , TNF-α, IFN-γ.....	38
16.	Hipotesis <i>Pathway</i> pengaruh induksi senyawa karsinogen dan pemberian Ekstrak <i>E. scaber</i> .....	40



## DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1.	Sertifikat laik etik.....	49
2.	Determinasi Daun Tanaman Tapak Liman ( <i>E. scaber</i> ) .....	50
3.	Analisis HPLC Ekstrak <i>E. scaber</i> .....	51
4.	Perhitungan Dosis Permodelan Kanker Payudara .....	53
5.	Uji Homogenitas .....	54
6.	Uji Tukey .....	59
7.	Analisis Path .....	62
8.	Sertifikat Uji Plagiasi .....	67







## DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
APC	Antigen Presenting Cell
CD	Cluster of Differentiation
DMBA	7,12-Dimethylbenz[a]anthracene
H&E	Hematoxylin dan Eosin
IL	Interleukin
NFκB	Nuclear Factor Kappa Beta
PPAR-γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
TGF-β	Transforming Growth Factor β
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α
NK	Natural Killer
IFN-γ	Interferon



## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan penyakit yang terjadi peningkatan setiap tahunnya. Kanker payudara merupakan penyakit kanker pertama yang banyak diderita oleh wanita (King, 2000). Berdasarkan semua kejadian kanker, kanker payudara di Indonesia merupakan penyakit terbanyak kedua setelah kanker paru (WHO, 2010). Salah satu penyebab utama terjadinya kanker yaitu inflamasi kronis. Data epidemiologi membuktikan bahwa lebih dari 25% dari semua kanker berhubungan dengan inflamasi kronis (Vendramini & Carvalho, 2012). Kanker dan inflamasi yang saling berkaitan terjadi melalui dua jalur yaitu jalur intrinsik dan ekstrinsik. Terjadinya inflamasi seperti sekresi kemokin dan sitokin akan meningkatkan resiko kanker selama adanya faktor intrinsik seperti terjadinya perubahan genetik dari aktivasi proto-onkogen dan inaktivasi gen supresor tumor (Mantovani dkk., 2008).

Terjadinya kanker akan menyebabkan perubahan sistem imun di dalam tubuh. Hal tersebut disebabkan karena terdapat sel kanker yang dapat dikenali oleh sistem imunitas dan tidak dapat dikenali oleh sistem imun di dalam tubuh. Salah satu penyebab sel kanker tidak dapat dikenali oleh sistem imun karena sel kanker menghasilkan sitokin yang dapat mencegah kerja dari respon imun seperti sitokin TGF- $\beta$ . Jumlah sitokin TGF- $\beta$  yang semakin meningkat akan menghambat kerja sel T CD4 sehingga jumlah sitokin yang dihasilkan seperti IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$  akan menurun. Jumlah sel T CD4 yang semakin berkurang akan menurunkan jumlah dari sitokin TNF- $\beta$  dan TNF- $\alpha$  yang dihasilkan makrofag. Selain menghasilkan sitokin TGF- $\beta$ , sel kanker tidak mengekspresikan MHC I atau mengekspresikan MHC I dalam jumlah yang sedikit. Jumlah MHC I yang semakin menurun akan menyebabkan fungsi, proliferasi, dan maturasi sel T CD8 semakin menurun. Suatu sel T yang telah terpapar oleh antigen seperti adanya kanker tersebut akan teraktivasi sehingga kehilangan ekspresi CD62L yang merupakan molekul adhesi (Rifa'i, 2011; Evans dkk., 2006).

Terdapat beberapa cara dalam usaha penyembuhan kanker seperti kemoterapi dan radioterapi. Namun, terapi tersebut tidak sepenuhnya menanggulangi kanker sehingga kombinasi pengobatan sangat dibutuhkan dalam pengobatan kanker. Salah satu cara yang

umumnya dikombinasikan adalah pengobatan alternatif. Salah satu pengobatan alternatif yang banyak dilakukan yaitu penggunaan obat herbal.

Indonesia merupakan negara megabiodiversitas memiliki tanaman yang berpotensi sebagai tanaman obat atau herbal. Berdasarkan berbagai studi, diketahui banyak masyarakat menggunakan tanaman obat untuk perawatan kesehatannya. Pencegahan kanker melalui tanaman obat dapat dilakukan dengan memberikan senyawa kemopreventif yang dapat menghambat dan menekan proses karsinogen, sehingga dapat mencegah pertumbuhan kanker (Kakizoe, 2003). Senyawa flavonoid dan isoflavonoid dari tanaman mampu menghambat proses karsinogenesis (Ren dkk., 2003).

Salah satu tanaman obat yang berpotensi sebagai obat herbal yaitu *E. scaber* atau Tapak Liman. Tapak Liman merupakan tanaman yang mengandung beberapa senyawa seperti flavonoid, alkaloid, tanin, fenol, steroid, terpenoid, saponin, isodeoxyelephantopin, dan juga deoxyelephantopin. Deoxyelephantopin dan isodeoxyelephantopin telah dilaporkan dapat menginduksi terjadinya apoptosis dan menghambat aktivasi Nf-kB pada sel kanker (Yong Ho dkk., 2009; Ichikawa dkk., 2006).

Ekstrak *E. scaber* merupakan tumbuhan yang mengandung senyawa anti-inflamasi, bersifat analgesik, menghasilkan antioksidan, dan antimikroba. Kandungan flavonoid dalam ekstrak Tapak Liman dapat berperan dalam anti-inflamasi melalui mekanisme inhibisi enzim siklooksigenase. Kandungan anti-inflamasi dalam ekstrak *E. scaber* tersebut akan menekan terjadinya inflamasi sehingga meminimalkan terjadinya kanker. Selain itu, flavonoid dapat mencegah tumorigenesis melalui beberapa mekanisme yaitu aktivitas isoenzim sitokrom P450, induksi enzim glutathione S-transferase (GST) dan inhibisi oksidatif. Aktivitas isoenzim menginhibisi sitokrom P450 yaitu CYP1A1 dan CYP1A1 atau DMBA yang menyebabkan karsinogen tidak reaktif (Dandekar dkk., 1986; King, 2000).

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak *E. scaber* pada dosis 50 mg/kg BB dapat menaikkan jumlah relatif sel T CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> pada mencit infeksi dan juga dapat meningkatkan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> pada mencit bunting (Roficco & Djati, 2014; Faizah & Djati, 2014). Sehingga, berdasarkan uraian di atas, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak *E. scaber* dalam pengobatan kanker payudara melalui mekanisme sistem imunitas tubuh yang sesuai dengan pernyataan Roy dkk. (2015) bahwa *E. scaber* sebagai anti-kanker. Penelitian ini menggunakan mencit betina BALB/c yang diinduksi menggunakan 7,12-dimetilbenz(a)antrasen (DMBA) dan hormon estrogen.

Menurut King (2000), DMBA bersifat karsinogen yang akan membentuk *DNA adduct*, yang merupakan suatu proses awal inisiasi.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dapat diambil dari penjelasan latar belakang diatas yaitu:

1. Bagaimanakah pengaruh perubahan kuantitatif sel T  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD4^+CD62L^+$ ,  $CD8^+CD62L^+$ ,  $CD4^+IFN-\gamma^+$  dan  $CD4^+TNF-\alpha^+$  pada organ *spleen* mencit kanker yang diinduksi DMBA dan Estradiol?
2. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak daun *E. scaber* terhadap perubahan kuantitatif sel T  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD4^+CD62L^+$ ,  $CD8^+CD62L^+$ ,  $CD4^+IFN-\gamma^+$  dan  $CD4^+TNF-\alpha^+$  pada organ *spleen* mencit kankeryang diinduksi DMBA dan Estradiol?

## 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh perubahan kuantitatif sel T  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD4^+CD62L^+$ ,  $CD8^+CD62L^+$ ,  $CD4^+IFN-\gamma^+$  dan  $CD4^+TNF-\alpha^+$  pada organ *spleen* mencit kanker yang diinduksi DMBA dan Estradiol.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun *E. scaber* terhadap perubahan kuantitatif sel T  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD4^+CD62L^+$ ,  $CD8^+CD62L^+$ ,  $CD4^+IFN-\gamma^+$  dan  $CD4^+TNF-\alpha^+$  pada organ *spleen* mencit kanker yang diinduksi DMBA dan Estradiol.

## 1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini yaitu:

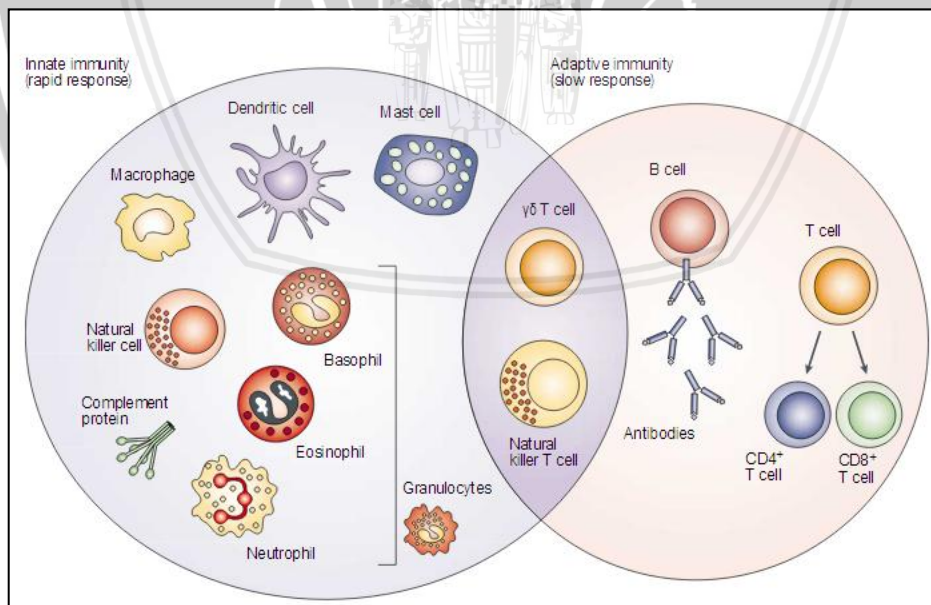
1. Memberikan informasi mengenai ekstrak daun *E. scaber* terhadap perubahan sistem imunitas tubuh pada mencit BALB/c model kanker payudara.
2. Penelitian ini diharapkan memberikan informasi tambahan terkait pengaruh ekstrak *E. scaber* terhadap perubahan sel T imunokompeten dan sitokin proinflamasi.
3. Merangsang para peneliti lain untuk mengembangkan ekstrak *E. scaber* sebagai obat herbal yang efektif untuk anti kanker.



## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Sistem Imunitas Tubuh dalam Kanker

Sistem imunitas tubuh merupakan suatu sistem yang berperan dalam pertahanan tubuh terhadap benda asing yang masuk. Sistem imun terdiri dari sistem imun non-spesifik dan sistem imun spesifik jika dibagi berdasarkan respon imunnya. Pertahanan non-spesifik terjadi sejak lahir untuk melawan benda asing yang terdiri dari semua perlindungan fisik, mekanik, biokimia, humoral, dan seluler. Pertahanan fisik berupa pertahanan kulit, membran mukosa, zat yang dilepas oleh leukosit, dan sel-sel fagosit. Pertahanan biokimia berupa zat-zat kimia seperti pH asam yang dikeluarkan oleh kelenjar keringat dan asam lambung yang akan menangani mikroba yang lolos dari pertahanan fisik. Pertahanan humoral berupa molekul-molekul yang larut untuk melawan antigen. Molekul larut yang bekerja dalam hal ini yaitu interferon (IFN), kateksidin, defensin, dan sistem komplemen. Pertahanan seluler berupa pertahanan yang melibatkan sel-sel imun seperti neutrofil, basofil, monosit, eosinofil, makrofag, sel mast, dan sel NK. Pertahanan non-spesifik (respon innate) bekerja dengan cepat dan selalu siap jika terdapat antigen yang masuk ke dalam tubuh (Gambar 1) (Harti, 2013; Abbas dkk., 2007).

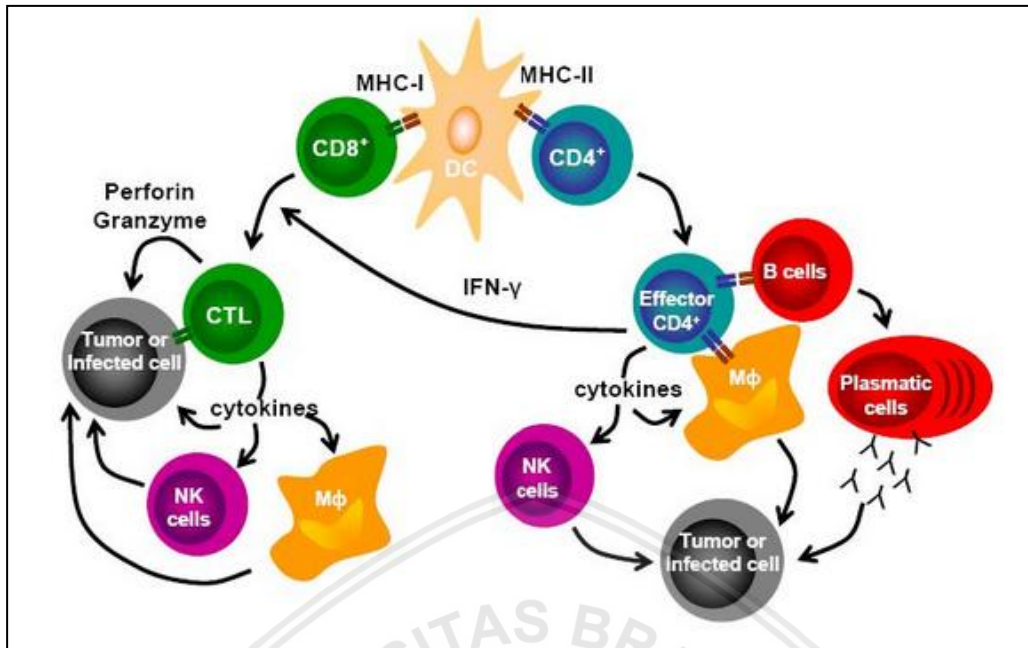


**Gambar 1.** Respon Imunitas Tubuh (Respon innate dan respon adaptive). Respon innate berfungsi dalam perlindungan pertama terhadap infeksi. Respon imun adaptive memiliki respon lambat tetapi dapat mengikat antigen secara spesifik (Dranoff, 2004).

Sistem imun spesifik merupakan sistem imun adaptif yang diinduksi melalui paparan terhadap agen infeksi yang spesifik. Sistem tersebut membutuhkan pengenalan dahulu sehingga membutuhkan waktu yang agak lama untuk menimbulkan respon. Pertahanan yang diberikan dapat bertahan lama karena sistem imun tersebut memiliki memori terhadap paparan yang didapat. Komponen sistem imun tersebut meliputi organ limfoid primer (sumsum tulang dan timus) dan jaringan limfoid sekunder (*lymphnode, limpa, adenoid, Peyer patch, dan apendiks*). Respon imun spesifik terdiri dari respon imun humoral dan seluler. Imunitas humoral diperantarai oleh antibodi yang diproduksi oleh sel B. Sistem imun seluler berupa sel T yang dapat melawan antigen yang hidup intraseluler, tumor, virus, jamur, dan parasit. Sel T tersebut yang akan memicu terbentuknya sel seperti  $CD4^+$  dan  $CD8^+$  (Gambar 1) (Male dkk., 2006).

Salah satu komponen penting yang dapat mengenali bagian antigen secara spesifik yaitu sel limfosit. Sel limfosit dihasilkan oleh organ limfoid primer yang kemudian akan menuju ke organ limfoid perifer. Proliferasi limfoid akan membentuk sel-sel limfosit, salah satunya sel T. Sel T dibagi menjadi sel T  $CD4$  dan  $CD8$ . Sel T  $CD4$  yang teraktivasi akan menjadi sel efektor ( $CD4^+$ ) yang mampu berikatan dengan molekul MHC (*Major Hystocompatibility Complex*) kelas II yang berfungsi dalam aktifitas sel B dan makrofag. Sel T *helper*  $CD4^+$  akan memproduksi sitokin yang secara langsung bersifat toksik dan dapat menstimulasi fungsi sel T efektor yang lain serta mengerahkan mekanisme inflamasi dan produksi antibodi dari sel B.

Sel limfosit  $CD8$  merupakan sel T sitotoksik yang berfungsi dalam menangani sel-sel yang terinfeksi virus dan memiliki kemampuan untuk mengekspresikan molekul permukaan  $CD8$  serta dapat berikatan dengan molekul MHC kelas I. Sel  $CD8$  yang telah teraktivasi ( $CD8^+$ ) merupakan salah satu sel yang efektif dalam melisis secara langsung sel yang terinfeksi. Jumlah  $CD4^+$  dan  $CD8^+$  yang semakin berkurang akan menyebabkan pengurangan inflamasi. Hal tersebut disebabkan karena sel T  $CD4^+$  dan  $CD8^+$  mampu mensekresikan sitokin. Sel T  $CD4^+$  dibedakan menjadi sel T helper 1 (Th1) dan sel T helper 2 (Th2). Sel Th1 mensekresikan interleukin 2 (IL-2), interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) dan faktor nekrosis tumor  $\beta$  (TNF- $\beta$ ). Sel T helper 2 (Th2) akan memproduksi IL-4, IL-5, IL-6, dan IL-10. Sel T  $CD8^+$  sama seperti  $CD4^+$  Th1 dalam spektrum sitokin yang dapat disekresikan (Purton dkk., 2000; Bommhardt dkk., 2004; Rifa'i, 2011).



**Gambar 2.** Perkembangan sel  $CD4^+$  dan  $CD8^+$ . Sel  $CD4^+$  naive akan mengikat MHC II melalui APC dan menjadi teraktivasi. Perbanyak aktivasi sel T helper, akan mengaktivasi sel B dan sel T  $CD8^+$ , yang akan menjadi sel T sitotoksik. Sel T sitotoksik akan membunuh sel yang terinfeksi atau kanker (Pacheco dkk., 2012)

Sel T dikatakan teraktivasi apabila sel tersebut kehilangan ekspresi CD62L, dimana sel T yang belum terpapar antigen akan mengekspresikan molekul CD62L. Molekul CD62L merupakan glikoprotein transmembran yang berikatan pada kelompok karbohidrat sialilate. Molekul CD62L merupakan kunci pereregulasi dari pergerakan sel T. Hal tersebut dikarenakan ekspresi CD62L pada permukaan sel T yang teraktivasi dapat memodulasi dan mengontrol sel T untuk masuk ke limfa nodus setelah terjadi infeksi akut. Sel T yang teraktivasi oleh antigen dan mengekspresikan CD62L maka sel tersebut kehilangan kemampuan untuk memasuki limpa nodus Molekul CD62L akan melakukan perlekatan pada sel endotel sepanjang pembuluh darah dan bersirkulasi dalam darah, limpa, dan limfa nodus perifer sampai sel tersebut bertemu dengan antigen spesifik (Wirth dkk., 2009; Rifa'i, 2011).

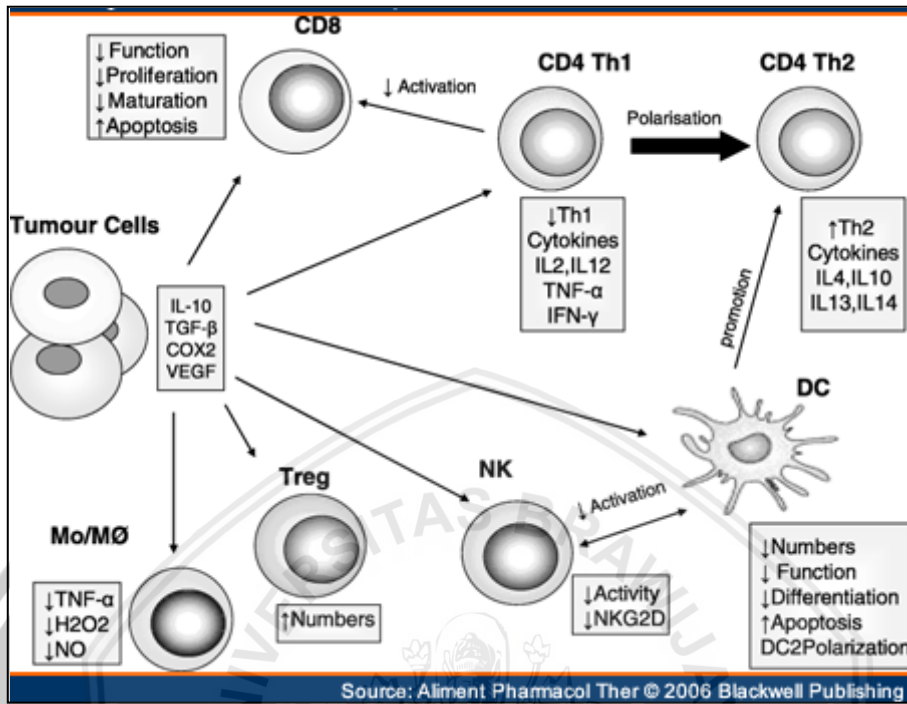
Kanker dapat menyebabkan perubahan sistem imunitas di dalam tubuh. Timbulnya kanker memiliki dua mekanisme dalam sistem imun, yaitu kanker dapat dikenali oleh sistem imun dan mekanisme kanker yang dapat melepaskan diri dari sistem imun. Kanker yang dapat dikenali sistem imun atas dasar dalam ekspresi profil proteinnya. Imunitas seluler pada kanker lebih banyak berperan dibandingkan imunitas humoral, namun tubuh



juga membentuk antibodi terhadap antigen kanker sehingga sel kanker akan mengalami lisis dan opsonisasi. Mekanisme seluler terhadap sel kanker yaitu dengan cara destruksi oleh sel T sitotoksik, destruksi oleh sel NK (*Natural Killer*) dan destruksi oleh makrofag. Antigen yang disekresikan oleh sel kanker dapat memacu sel T sitotoksik untuk menghancurkan sel kanker. Antigen yang disekresikan sel kanker dapat dikenali oleh sel T sitotoksik melalui presentasi antigen oleh MHC-1 (*Major Histocompatibility Complex*). Antigen yang telah dikenali oleh sel T, sel T akan mengeluarkan sitokin dan dapat menghancurkan sel target terhadap antigen yang dituju. Sel T akan berproliferasi melalui *Autocrin Growth Pathway* yaitu sel T mengeluarkan sitokin peningkat pertumbuhan. Selain melalui pengenalan antigen oleh MHC-I, antigen tumor juga dapat dipresentasikan oleh MHC-II untuk dikenali oleh sel Th1. Aktivasi sel Th 1 akan memproduksi sitokin seperti IFN- $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ), TNF- $\beta$  (Tumor Necrosis Factor- $\beta$ ), IL-2 (*Interleukin-2*) dan menstimulasi sel T CD8<sup>+</sup> pada antigen tumor yang dipresentasikan oleh MHC-I (Gambar 3). Sitokin IFN- $\gamma$  yang dihasilkan oleh sel Th1 akan mengaktifkan makrofag dan sel NK, sehingga kemampuan makrofag untuk memfagositosis sel tumor akan bertambah. Sel NK yang mengenali sel tumor, akan menghasilkan perforin yang berperan dalam melubangi membran sel tumor. Sel NK tersebut akan melepaskan NKCF (*Natural Killer Cytotoxic Factor*) yang akan ditelan oleh sel tumor melalui reseptor NKCF sehingga terjadi lisis pada sel tumor. Selain sel NK, makrofag juga memiliki kemampuan dalam membunuh sel tumor dengan memproduksi sitokin TNF (*Tumor Necrosis Factor*). Sitokin TNF dalam membunuh sel tumor dengan cara menginduksi trombosis pada pembuluh darah tumor sehingga sel tumor menjadi nekrosis serta melalui ikatan TNF dengan reseptor permukaan sel tumor yaitu melalui proses apoptosis (Abbas, 2007; Evans dkk., 2006).

Mekanisme sel kanker mempunyai mekanisme untuk menghindari diri dari imunitas non spesifik maupun spesifik. Sel kanker tidak dapat dipresentasikan karena tidak memiliki molekul kostimulator seperti B7 (CD80) dan CD 86. Sel kanker tidak mengekspresikan molekul yang diperlukan untuk mengaktifkan sel T terutama MHC-II atau molekul adhesi ICAM-I atau LFA-3. Terdapat beberapa sel kanker yang hanya mengekspresikan sedikit MHC-I yang dapat menimbulkan resistensi terhadap sel T sitotoksik. Selain itu, sel kanker juga mengekspresikan berbagai faktor immunosupresif seperti TGF- $\beta$  yang merupakan sitokin immunosupresif. Hal tersebut menyebabkan penurunan regulasi berbagai proses yang diperlukan untuk aktivitas sel T- sitotoksik. Mekanisme tersebut terjadi dengan cara mempengaruhi keseimbangan Th1-Th2 ke arah Th2. Penghambatan sitokin yang dihasilkan oleh sel Th1 yaitu IL-12, penghambatan APC (*Antigen Presenting Cells*) pada

MHC II, dan penurunan regulasi adesi. Sitokin TGF- $\beta$  juga mengurangi molekul MHC I yang dapat menyebabkan aktifitas sel T CD8<sup>+</sup> (Abbas, 2007).



**Gambar 3.** Pengaruh kanker terhadap sistem imunitas tubuh (Evans dkk., 2006)

## 2.2 Kanker Payudara

Penyakit kanker merupakan penyakit yang menjadi masalah didunia. Kanker berasal dari bahasa latin yaitu *carcinoma*. Istilah lain yang digunakan dalam dunia medis yaitu neoplasma dan tumor. Neoplasma berasal dari bahasa Yunani *neos* yang berarti baru dan *plasma* yang berarti pembentukan. Tumor berasal dari bahasa latin *tumere* yang berarti pembengkakan. Penyakit kanker ditandai dengan pertumbuhan sel yang terjadi secara terus menerus atau abnormal pada jaringan. Terdapat ciri-ciri dari penanda tumbuhnya kanker, yaitu kontrol pertumbuhan yang tidak terbatas, invasi pada jaringan sekitar, dan metastasis atau penyebaran ke bagian tubuh lain. Penyebaran sel kanker terjadi melalui aliran darah maupun kelenjar getah bening. Pertumbuhan kanker yang tidak terkendali disebabkan oleh adanya kerusakan DNA yang mengakibatkan mutasi gen penyandi protein yang mengendalikan pertumbuhan. Penyebab kanker tersebut dapat terjadi melalui faktor eksternal maupun internal. Faktor eksternal melalui radiasi, senyawa kimia karsinogen, dan virus, sedangkan faktor endogen berupa gen, hormon, dan enzim tertentu (Jerry, 2007; Lee, 2007; Warren dkk., 2002).

Salah satu penyakit kanker yang banyak diderita didunia yaitu kanker payudara. Beberapa faktor penyebab pertumbuhan kanker yaitu keberadaan hormon estrogen yang abnormal, onkogen atau gen pemicu pembelahan sel secara berlebih, hilangnya gen supresor untuk tumor, dan keberadaan bahan karsinogen. Keberadaan kanker dapat ditandai dengan adanya benjolan, perubahan ukuran, kulit yang kemerahan, keberadaan areola (lingkaran hitam disekitar puting susu), ruam, pengencangan atau pelonggaran payudara, perbedaan ukuran kedua payudara, dan rasa sakit di daerah payudara (Tjidarbumi, 1986; Mish dkk., 1990; Jerry, 2007; Lee, 2007; Warren dkk., 2002).

### 2.3 Senyawa Penginduksi Kanker

Senyawa DMBA (7,12 *dimethylbenz (α) antrasen*) merupakan zat karsinogen yang memiliki potensi yang lebih tinggi dan lebih stabil untuk pembuatan model kanker pada hewan coba. Senyawa DMBA berbentuk padat, berwarna kuning kehijauan, memiliki rumus empiris  $C_{20}H_{16}$ , dengan berat molekul 253,34 g/mol. Senyawa DMBA yang diinduksikan dalam tubuh akan dimetabolisme di hati oleh sitokrom P450 CYP1A1 atau CYP1B1 dan mEH (*microsomal epoxides hydrolase*) di jaringan periferal membentuk ikatan kovalen menjadi DMBA 3,4 diol-1,2 epoxida (DMBA-DE) membentuk DNA *adduct*. Metabolit DMBA yang membentuk DNA *adduct* menentukan mutasi dalam gen dan mampu mengendalikan siklus sel, sehingga mendorong pembelahan sel kanker. Senyawa epoxida nantinya akan berikatan secara kovalen dengan gugus amino eksosiklik deoksiadenosin (dA) atau deoksiguanosin (dG) pada DNA. Interaksi DNA *adduct* dapat menginduksi mutasi pada gen-gen penting, sehingga menyebabkan inisiasi kanker. Metabolisme DMBA akan menyebabkan kerusakan DNA yang berpengaruh pada gen-gen pengatur pertumbuhan sehingga akan terjadi pertumbuhan yang tidak terkontrol. Pertumbuhan yang berlebih akan terjadi di semua sel endotel dan berpengaruh pada peningkatan produksi VEGF dan terjadi angiogenesis. Angiogenesis adalah pembentukan pembuluh darah baru yang berguna mensuplai nutrisi dan oksigen ke sel kanker sehingga dapat berkembang terus menerus. Keberadaan karsinogen ini umumnya mengakibatkan mutasi gen *ras* dan meningkatkan ekspresi Ras dan fos (Miyata dkk., 1999; King, 2000; Anonim, 2007).

Terdapat beberapa cara dalam mempercepat pertumbuhan kanker, salah satunya yaitu menggunakan hormon estrogen. Hormon estrogen merupakan hormon reproduksi yang dihasilkan oleh kelenjar gonad. Berdasarkan kasus kanker payudara, hormon estrogen yang semakin meningkat di dalam tubuh, akan meningkatkan resiko terjadinya kanker

payudara. Hal tersebut disebabkan karena hormon estrogen memiliki efek karsinogen melalui mekanisme *estrogen receptor (ER) dependent* dan *ER-independent*. Mekanisme jalur *estrogen receptor (ER) dependent* terjadi dengan melibatkan aktivasi ER oleh estrogen, yang mengarahkan ke ekspresi gen respon estrogen, serta menstimulasi pertumbuhan dan proliferasi sel. Mekanisme jalur *ER-independent* terjadi melibatkan generasi metabolit estrogen genotoksik, yang sangat reaktif dan merusak DNA. Estrogen dengan  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) dimetabolisme menjadi estrogen *catechol 2-hydroxyestradiol (2-OHE<sub>2</sub>)* dan *4-hydroxyestradiol (4-OHE<sub>2</sub>)* oleh sitokrom P450 1A1 (Cyp1A1) dan sitokrom P450 1B1 (Cyp1B1). Sementara, 2-OHE<sub>2</sub> dan 2-metoksiestradiol memiliki karakteristik kemoprotektif yang bersifat testatif dan 4-OHE<sub>2</sub> bersifat genotoksik. Metabolisme estrogen tumor seperti 4-OHE<sub>2</sub> mengalami metabolisme oksidatif untuk membentuk kuinon elektrofilik, yang mudah bereaksi dengan DNA untuk menghasilkan produk sampingan. Selain itu, siklus redoks quinones dan semiquinones menghasilkan pembentukan radikal bebas dan spesies oksigen reaktif, sehingga menciptakan lebih banyak peluang untuk kerusakan genetik (Liehr dkk., 1986; Cavalieri dkk., 2006; Yager & Davidson, 2006).

#### 2.4 *Elephantopus scaber*

*E. scaber* atau Tapak Liman merupakan herba yang memiliki daun pada bagian bawah batang membentuk roset. Tinggi tumbuhan tersebut mencapai 0,5- 2,0 m. Daun berbentuk jorong dengan panjang daun 4-8 cm dan lebar daun 1-2 cm. Tepi daun tumbuhan tersebut bergerigi dan memiliki tulang daun menyirip. Tumbuhan ini memiliki panjang batang 6-8 cm, berbentuk silindris dengan percabangan pendek. Sistem perakaran *E. scaber* yaitu akar tunggang. Berikut merupakan klasifikasi dari tumbuhan *E. scaber*. *E. scaber* merupakan tumbuhan yang terdistribusi di negara Thailand. (Yong Ho dkk., 2009; Hiradeve dan Rangari, 2013):

Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiosperma
Kelas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Asterales
Familia	: Asteraceae
Genus	: <i>Elephantopus</i>
Jenis	: <i>Elephantopus scaber</i> , L.

*E. scaber* banyak digunakan sebagai tanaman obat karena mampu menghasilkan aktifitas antimikrobia, bersifat analgesik, antipiretik, dan antiinflamatori. Beberapa senyawa yang terkandung dalam *E. scaber* yaitu terpenoid, fenol, flavonoid, steroid, triterpenes, stigmasterol, lupeol, epofriedelinol, dan sesquiterpene lactones. Kandungan flavonoid dari *E. scaber* pada penelitian Yuliani (2015) menunjukkan kandungan flavonoid yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan tumbuhan Asteraceae yang lain (Yong Ho dkk., 2009; Hiradeve dan Rangari, 2013).

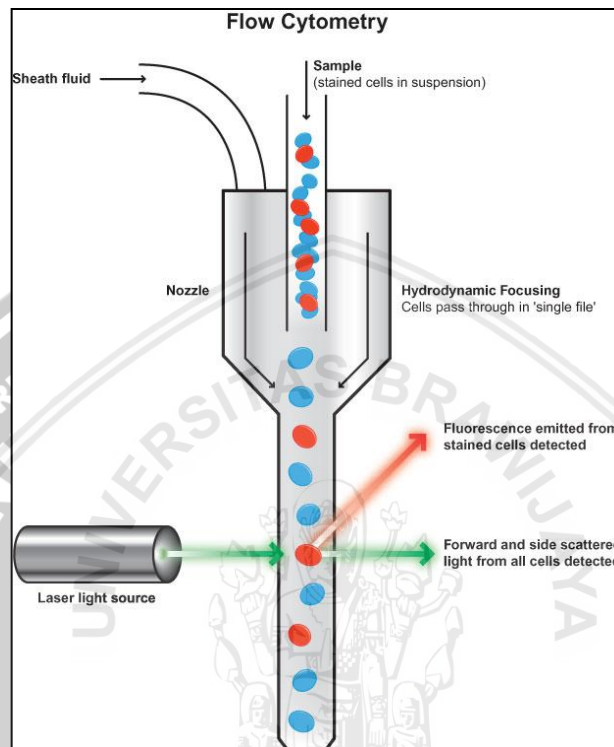


**Gambar 4.** Bagian dari tumbuhan *E. scaber* (Yong Ho dkk., 2019)

## 2.5 *Flow Cytometry*

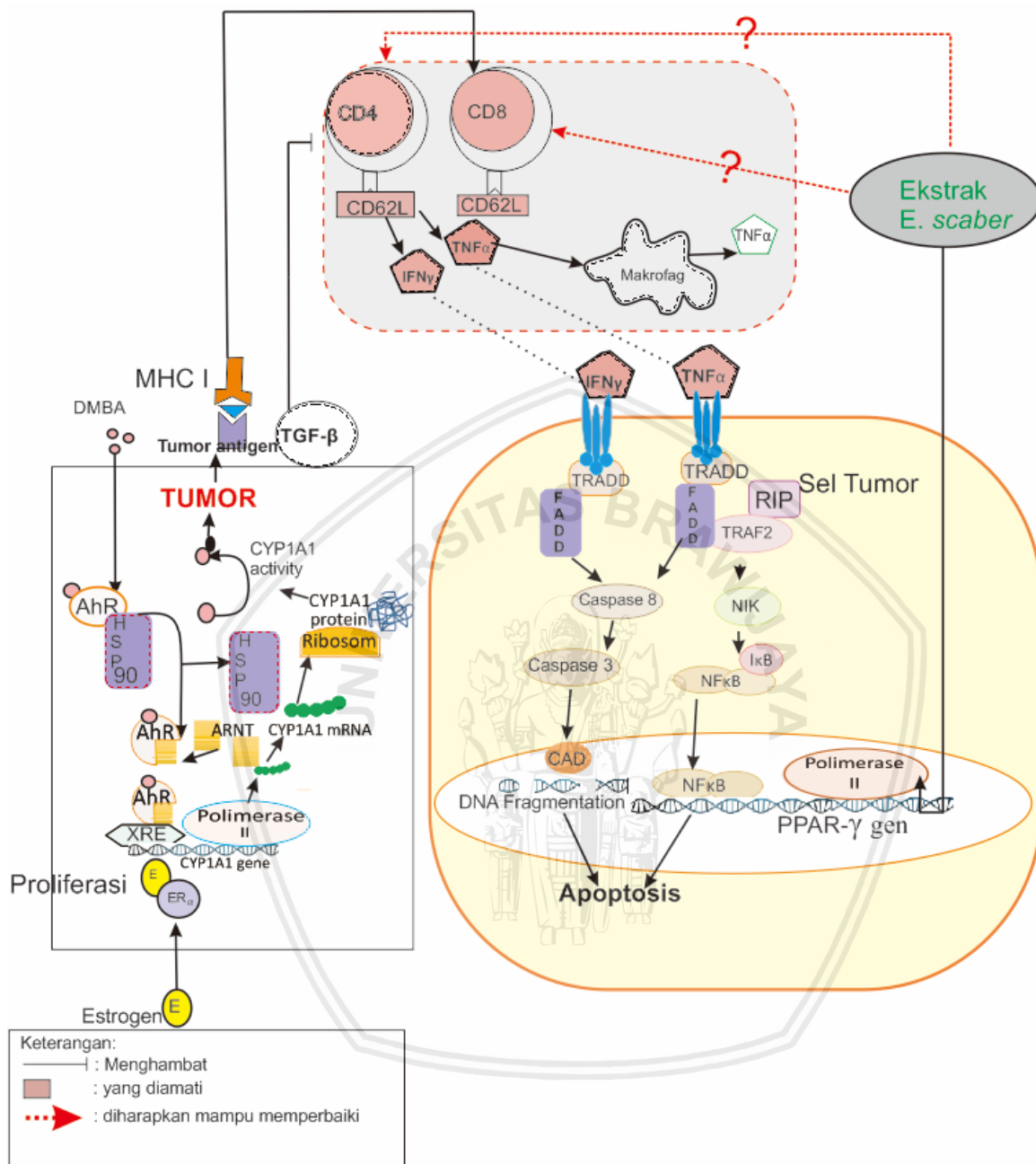
*Flow Cytometry* merupakan teknik berbasis antibodi yang digunakan untuk menganalisis berbagai komponen seluler dan fungsi sel. *Flow Cytometry* secara normal digunakan untuk menghitung populasi sel limfosit tertentu, sehingga dapat menjelaskan secara spesifik persentase limfosit yang mengandung kombinasi tertentu dari protein permukaan yang spesifik seperti marker immunoglobulin atau *cluster of differentiation* (CD) atau produksi tertentu seperti sitokin yang menggunakan *intracellular cytokine staining* (ICSI).. *Flow Cytometry* dapat digunakan untuk mengidentifikasi karakteristik permukaan setiap sel dengan kemampuan memisahkan sel-sel yang berada dalam suatu suspensi menurut karakteristik masing-masing secara otomatis melalui celah yang ditembus oleh seberkas sinar laser. Prinsip yang digunakan dalam *flow cytometry* yaitu dengan cara menyebarkan cahaya, eksitasi cahaya, dan pemancaran molekul fluokrom

untuk menghasilkan multiparameter data yang spesifik dari partikel dan sel (Gambar 5.). Kekurangan metode *flow cytometry* yaitu kurang praktis, lebih mahal, dan tidak semua sarana kesehatan di daerah mempunyai alat yang menggunakan metode tersebut. Namun, kelebihan dari metode tersebut yaitu lebih akurat dan tidak bersifat subjektif (Umi dkk., 2003).



Gambar 5. Prinsip kerja *flowcytometry* (Abcam, 2014)

## 2.6 Kerangka Konsep



**Gambar 6.** Kerangka konsep penelitian Pengaruh Ekstrak Tapak Liman (*Elephantopus scaber*) dalam Mengaktifkan Sel-sel Imunokompeten dan Perubahan Sitokin Proinflamasi pada Mencit Model Kanker yang Diinduksi DMBA dan Estradiol

Kanker payudara dalam hewan coba dapat diinduksi dengan menggunakan zat karsinogenik seperti DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene). Hal tersebut menyebabkan semakin meningkatkan terjadinya inflamasi akut di dalam tubuh. Inflamasi tersebut akan menyebabkan aktifnya sitokin-sitokin proinflamasi. Inflamasi yang terus

menerus terjadi akan mengakibatkan terjadinya mutasi gen. Mutasi gen akan menyebabkan sel normal gagal dalam merespon sinyal apoptosis, sehingga sel normal yang seharusnya mengalami apoptosis akan terus mengalami proliferasi. Zat karsinogen DMBA akan dimetabolisme di hati oleh sitokrom P450 CYP1A1 atau CYP1B1 dan mEH (*microsomal epoxides hydrolase*) di jaringan periferal membentuk ikatan kovalen menjadi DMBA 3,4 diol-1,2 epoxida (DMBA-DE) membentuk DNA *adduct*. Metabolit DMBA yang membentuk DNA *adduct* menentukan mutasi dalam gen dan mampu mengendalikan siklus sel, sehingga mendorong pembelahan sel kanker. Sel kanker dalam tubuh memiliki mekanisme dalam menghindari dari sistem imunitas tubuh sehingga tidak dikenali. Salah satu mekanisme yang terjadi yaitu, sel kanker dapat memproduksi berbagai sitokin yang mencegah kerja dari respon imun seperti TGF- $\beta$ . Selain menghasilkan TGF- $\beta$ , sel kanker sedikit mengekspresikan MHC I. Jumlah sitokin TGF- $\beta$  yang semakin meningkat akan menyebabkan penghambatan pada kerja sel T CD4 sehingga sitokin yang dihasilkan seperti IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$  akan menurun jumlahnya. Jumlah CD4 yang semakin berkurang akan menurunkan jumlah dari sitokin TNF- $\beta$  dan TNF- $\alpha$  yang dihasilkan makrofag. Sitokin TNF- $\beta$  dan TNF- $\alpha$  berperan dalam melisis sel kanker, sehingga ketika jumlahnya sedikit maka tidak mampu untuk menimbulkan lisis sel kanker. Selain melalui sel T CD4, sel kanker yang sedikit mengekspresikan MHC I akan menyebabkan fungsi, proliferasi, dan maturasi yang menurun sedangkan proses apoptosis CD8 semakin meningkat. Sitokin TGF- $\beta$  yang semakin meningkat juga akan menekan kerja dari sel T CD4 maupun CD8.

Tanaman *E. scaber* merupakan tanaman yang mengandung beberapa senyawa etanol seperti flavonoid dan juga deoxyelephantopin, dimana banyak literatur menyebutkan bahwa ekstrak tersebut dapat bermanfaat sebagai immunosupresan dan juga anti-inflamasi. Anti-inflamasi akan menekan terjadinya inflamasi sehingga meminimalkan terjadinya kanker, sedangkan immunosupresan akan mengaktifkan sel-sel imunokompeten. Sel-sel imunokompeten seperti sel T akan mengakibatkan terjadinya lisis pada sel kanker. Sehingga diharapkan ekstrak *E. scaber* mampu mengaktifkan kerja dari sel T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, dan sitokin proinflamasi. Ekstrak *E. scaber* akan masuk ke dalam sel melalui pengaktifan gen PPAR- $\gamma$  sehingga akan terjadi apoptosis dari sel kanker.



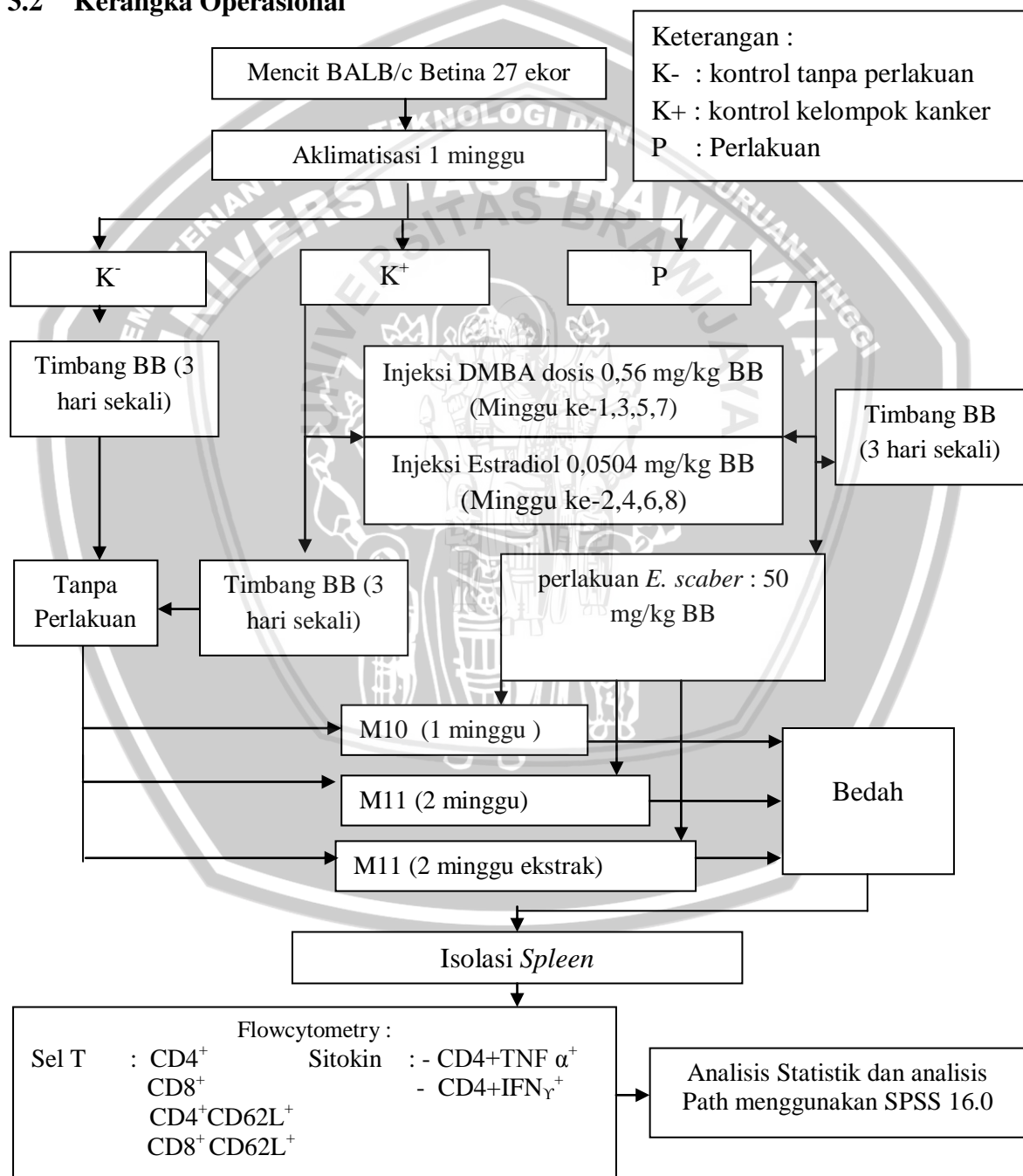


### BAB III METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2016 sampai dengan bulan Februari 2017 di Laboratorium Fisiologi Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

#### 3.2 Kerangka Operasional



**Gambar 7.** Kerangka operasional penelitian



### 1.3 Langkah penelitian

#### 3.3.1 Pembuatan Ekstrak Tapak Liman (*Elephantopus scaber*)

Serbuk kasar daun *E. scaber* diperoleh dari Material Medika Batu, Malang. Bubuk kasar yang diperoleh, kemudian dilakukan ekstraksi di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Serbuk *E. scaber* dilarutkan dalam pelarut etanol 50% dengan perbandingan simplisia:etanol 50% = 1:10 pada suhu ruang selama 5x24 jam, sambil diaduk 3 kali sehari sampai semua komponen terkestraksi. Setelah itu, ekstrak etanol disaring dengan kain saring dan ditampung dalam toples kaca. Sisa bahan penyaringan direndam lagi dengan etanol 50% (*remaserasi*) selama 2x24 jam. Kemudian bahan disaring kembali menggunakan kain saring. Ekstrak yang dihasilkan kemudian diuapkan untuk menghilangkan kandungan etanol dalam bahan ekstrak pada suhu 50°C dalam *water bath* menggunakan *vacuum pump evaporator*. *Crude* ekstrak berupa pasta, berwarna coklat tua, dan berbau khas diambil dan diletakkan dalam botol film berpenutup. Kemudian pasta disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C. Hasil akan berupa ekstrak pasta. Dosis ekstrak yang dipakai yaitu 50 mg/kg BB yang diperoleh berdasarkan penelitian sebelumnya menurut Roficco & Djati (2014) dan Faizah & Djati (2014) yang merupakan dosis terbaik dalam penelitian tersebut. Ekstrak yang telah ditimbang, dilarutkan dalam aquades hangat untuk membuat larutan stok dan dicampur hingga pasta terlarut.

#### 3.3.2 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) betina galur BALB/c yang diperoleh dari Malang Murine Fram, Singosari. Usia hewan coba yang digunakan adalah 4-5 minggu dan memiliki kondisi sehat yaitu bergerak aktif, bulu tidak rontok, dan tidak cacat. Penelitian ini menggunakan 3 perlakuan dengan masing-masing perlakuan 3 kali ulangan. Jumlah mencit yang digunakan yaitu sebanyak 27 ekor. Penelitian ini telah mendapat sertifikat Etik (*Ethical Clearence*) dari Komisi Etik Penelitian (*Animal Care and Use Committe*) Universitas Brawijaya, No.648-KEP-UB, yang dikeluarkan pada tanggal 8 Desember 2016 (Lampiran 1).

#### 3.3.3 Deskripsi Perlakuan dan Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Split Plot in Time yang terdiri dari 5 perlakuan dan 3 ulangan pada masing-masing perlakuan. Perlakuan mencit tersebut sebagai berikut:

**Tabel 1.** Kelompok perlakuan

P	M1	M2	M3	M 4	M 5	M6	M 7	M 8	M9	M10	M11	M12
K-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B1	B2	B3
K+	D	E	D	E	D	E	D	E	-	B1	B2	B3
PM1	D	E	D	E	D	E	D	E	SE	B		
PM2	D	E	D	E	D	E	D	E	SE	SE	B	
PM3	D	E	D	E	D	E	D	E	SE	SE	SE	B

**Keterangan :**

- P : Perlakuan
- K- : Kontrol negatif (tanpa perlakuan)
- K+ : Kontrol positif (kanker tanpa perlakuan ekstrak)
- PM1 : Perlakuan pemberian ekstrak selama minggu 1
- PM2 : Perlakuan pemberian ekstrak selama minggu 2
- PM3 : Perlakuan pemberian ekstrak selama minggu 3
- M : Minggu
- D : DMBA
- E : Estradiol
- SE : Sonde ekstrak
- B : Bedah
- : tanpa perlakuan

**3.3.4 Induksi Kanker Payudara pada Mencit BALB/c**

Model kanker payudara pada mencit BALB/c dilakukan dengan injeksi subkutan menggunakan DMBA (*7,12-Dimethylbenz(a)antrasena*) yang diperoleh dari SIGMA™ (D3254-100MG) dan hormon estradiol yang diperoleh dari TCI™ ( $\beta$ -Estradiol E0025) pada sekitar organ payudara mencit. Injeksi dilakukan 1 minggu sekali secara bergantian antara DMBA dan Estradiol dan dilakukan selama 8 minggu. Injeksi dilakukan disekitar organ payudara mencit secara subkutan sebanyak 0,3 ml pelarut dengan dosis 0,56 mg/kg BB mengikuti metode dari Cordeiro dan Kaliwal (2011). Senyawa DMBA dilarutkan dengan menggunakan minyak jagung. Hormon estrogen diberikan dengan dosis sebanyak 0,0504 mg/kg BB berdasarkan penelitian dari Naciff dkk. (2002). Pemberian hormon estrogen dilakukan untuk mempercepat pembentukan kanker.

**3.3.5 Pemberian ekstrak *E. scaber* pada Mencit BALB/c**

Percobaan dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan 5 kelompok mencit yang terdiri dari kelompok kontrol negatif (K<sup>-</sup>) tanpa perlakuan apapun atau mencit normal, kontrol positif (K<sup>+</sup>) yaitu kelompok mencit yang diinduksi kanker dan tanpa pemberian ekstrak, serta kelompok perlakuan yang diinduksi kanker payudara kemudian

repository.ub.ac.id

diberikan ekstrak *E. scaber* sebanyak 500 µl secara oral atau sonde. Kelompok perlakuan terdiri pemberian ekstrak terdiri dari 3 kelompok yaitu kelompok perlakuan minggu 1 dilakukan dengan menyonde ekstrak *E. scaber* selama 1 minggu. Kelompok ke-2 dilakukan dengan menyonde ekstrak *E. scaber* selama 2 minggu dan kelompok ke-3 dilakukan dengan menyonde ekstrak *E. scaber* selama 3 minggu. Pemberian Sonde dilakukan setelah mencit diinjeksi DMBA dan estradiol secara bergantian selama 8 minggu dan dinyatakan positif kanker payudara.

### 3.3.6 Pengamatan Mencit Pasca Induksi Kanker

Mencit yang telah diinduksi DMBA akan dilakukan pemeriksaan fisik dan penimbangan berat badan rutin. Pemeriksaan fisik dilakukan dengan proses perabaan (palpasi) pada daerah sekitar payudara. Hal tersebut dilakukan untuk memantau proses terbentuknya benjolan pada payudara. Penimbangan berat badan dilakukan setiap tiga hari sekali. Selain itu uji konfirmasi melalui pengamatan histologi payudara mencit juga dilakukan untuk mengetahui terjadinya proliferasi sel kanker.

### 3.3.7 Pembedahan Hewan Coba

Pembedahan hewan coba dilakukan 3 kali secara bertahap. Pembedahan pertama dilakukan setelah pemberian ekstrak *E. scaber* selama satu minggu, pembedahan kedua dilakukan setelah pemberian *E. scaber* selama dua minggu, dan pembedahan ketiga dilakukan setelah pemberian ekstrak *E. scaber* selama tiga minggu.

### 3.3.8 Isolasi Limfosit dari Organ *Spleen*

Seluruh mencit yang digunakan dalam penelitian didislokasi pada bagian leher dan dibedah untuk diisolasi Organ *Spleen*. Organ yang diperoleh, dicuci dengan PBS dan digerus dalam larutan PBS yang berbeda hingga seluruh sel menjadi larut dalam PBS. Suspensi disaring dan dimasukkan dalam tabung propilen 15 ml dengan volume mencapai 10 ml. Suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm, selama 5 menit pada suhu 10°C. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang dan pelet diresuspensi dengan 1 ml PBS.

### 3.3.9 Preparasi dan Analisis *Flow Cytometry*

Suspensi pelet dari masing-masing sampel sebanyak 50 µl dimasukkan kedalam *microtube* steril yang berisi 500 µl PBS. Suspensi selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm, selama 5 menit pada suhu 10 °C. Pelet kemudian dilakukan

repository.ub.ac.id

pewarnaan ekstraseluler dengan menambahkan 50 µl antibodi monoklonal (*Fluorescein isothiocyanate* (FITC)-conjugated rat anti-mouse CD4 (Biolegend™), Phycoerythrin (PE)-conjugated rat anti mouse CD8 (Biolegend™), PE-conjugated rat anti mouse CD62L (Biolegend™)), kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu 4 °C. Inkubasi yang telah dilakukan, setelah itu di tambah dengan 300 µl PBS dan dipindah ke dalam cuvet. Pewarnaan intraseluler dilakukan dengan menambahkan *cytofix-cytoferm* (SIGMA™) 50µl pada suspensi pelet dan diinkubasi selama 20 menit suhu 4 °C. Inkubasi yang telah dilakukan, selanjutnya ditambahkan *washperm* (SIGMA™) sebanyak 500 µl. Setelah itu, disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm, selama 5 menit pada suhu 10 °C. Pelet yang diperoleh, diwarnai dengan antibodi intraseluler (PE-conjugated rat anti mouse TNF-α (Biolegend™) dan PE-conjugated rat anti mouse IFN-γ (Biolegend™)) sebanyak 50 µl dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 4 °C. Setelah itu, ditambahkan 300 µl PBS dan dimasukkan ke dalam cuvet *flow cytometry*. Selanjutnya dipilih *acquire* dan akan terhitung jumlah sel total serta jumlah sel yang terdeteksi oleh label antibodi. Hasil yang diperoleh kemudian diolah dengan software *BD cellquest Pro™*.

### 3.3.10 Analisis Data

Penelitian ini dilakukan dengan metode analisis Anova Rancangan Acak Kelompok. Data yang diperoleh dianalisis dengan software *CellQuest* dan diuji dengan analisa statistik ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan  $P < 0,05$ . Analisis data dilakukan dengan menggunakan program *SPSS 16.0 for Windows*. Kemudian analisis *path* digunakan untuk menganalisis korelasi antara hubungan sebab-akibat yang dapat terjadi pada regresi berganda apabila variabel bebasnya memiliki pengaruh terhadap variabel tergantung.



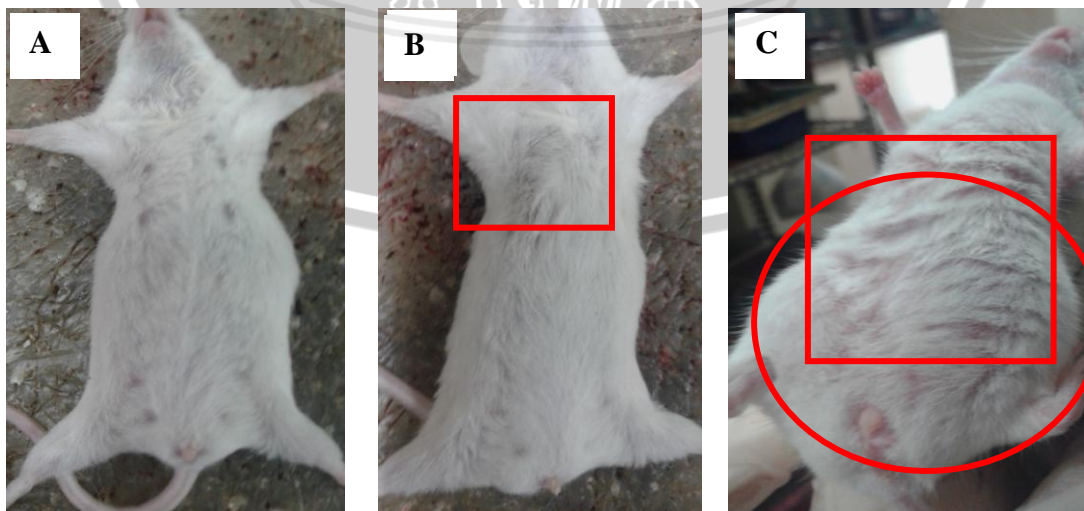
## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Pengaruh Induksi senyawa karsinogen (DMBA dan Hormon Estrogen) terhadap kondisi klinis Mencit

Senyawa DMBA merupakan senyawa 7,12-dimetilbenz ( $\alpha$ ) antrasen (DMBA) yaitu zat kimia yang termasuk dalam Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) yang dikenal bersifat mutagenik, teratogenik, karsinogenik, sitotoksik, dan immunosupresif. Senyawa DMBA dapat memicu terjadinya kanker salah satunya kanker payudara (Lee dkk., 2002). Hormon estrogen merupakan hormon yang memiliki efek karsinogen melalui mekanisme *estrogen receptor (ER) dependent* dan *ER-independent* yang digunakan untuk induksi kanker payudara (Cavalieri dkk., 2006; Yager & Davidson, 2006). Penelitian ini dilakukan dengan menginjeksi DMBA dan estradiol pada bagian payudara mencit selama 8 minggu.

Pengaruh DMBA dan estradiol pada mencit dapat dilihat melalui perabaan bagian payudara abdominal. Pengaruh tersebut dilihat dari adanya benjolan keras dibawah kulit. Watson (2008) menjelaskan bahwa benjolan keras tersebut menunjukkan terjadinya tumor payudara. Berdasarkan hasil pengamatan morfologi tubuh mencit, pada awal perlakuan yaitu tidak terjadi kerontokan bulu, dan perut juga masih terlihat normal, tidak mengalami kebuncitan. Perbedaan mulai terlihat pasca induksi DMBA dan estradiol, terjadi perubahan yaitu adanya kerontokan rambut mencit pada bagian tubuh mencit. Kerontokan tersebut tampak jelas pada Gambar 8 yaitu kerontokan pada bagian perut mencit. Menurut Rusmarilin (2008), pengaruh dari DMBA dan estradiol dapat dilihat dari adanya kerontokan rambut mencit.



**Gambar 8.** Kondisi klinis (A) Mencit normal; (B dan C) Payudara mencit kanker, kotak merah menunjukkan adanya kerontokan bulu pada tubuh mencit, lingkaran merah menunjukkan abnormalitas pembesaran perut mencit pasca induksi DMBA dan estradiol selama 8 minggu



**Tabel 2.** Pengamatan kondisi klinis Tubuh Mencit

Mencit			Keterangan
Kontrol negatif	Minggu 10	1	Perut tidak buncit, rambut tidak rontok
			Perut tidak buncit, rambut tidak rontok
			Perut tidak buncit, rambut tidak rontok
	Minggu 11	1	Perut tidak buncit, rambut tidak rontok
		2	Perut tidak buncit, rambut tidak rontok
		3	Perut tidak buncit, rambut tidak rontok
	Minggu 12	1	Perut tidak buncit, rambut tidak rontok
		2	Perut tidak buncit, rambut tidak rontok
		3	Perut tidak buncit, rambut tidak rontok
Kontrol positif	Minggu 10	1	Perut tidak buncit, rambut rontok
		2	Perut tidak buncit, rambut rontok
		3	Perut buncit, rambut rontok
	Minggu 11	1	Perut buncit, rambut rontok
		2	Perut tidak buncit, rambut rontok
		3	Perut buncit, rambut rontok
	Minggu 12	1	Perut buncit, rambut rontok
		2	Perut buncit, rambut tidak rontok
		3	Perut tidak buncit, rambut rontok
Perlakuan	Minggu 10	1	Perut tidak buncit, rambut rontok
		2	Perut buncit, rambut rontok
		3	Perut tidak buncit, rambut rontok
	Minggu 11	1	Perut tidak buncit, rambut rontok
		2	Perut buncit, rambut rontok
		3	Perut tidak buncit, rambut tidak rontok
	Minggu 12	1	Perut tidak buncit, rambut tidak rontok
		2	Perut buncit, rambut rontok
		3	Perut tidak buncit, rambut rontok

Menurut Bidaah (2013) dalam penelitiannya menunjukkan bahwa terjadi kerontokan rambut mencit. Kerontokan tersebut terjadi pada sekitar mulut dan kepala mencit serta

repository.ub.ac.id  
repository.ub.ac.id

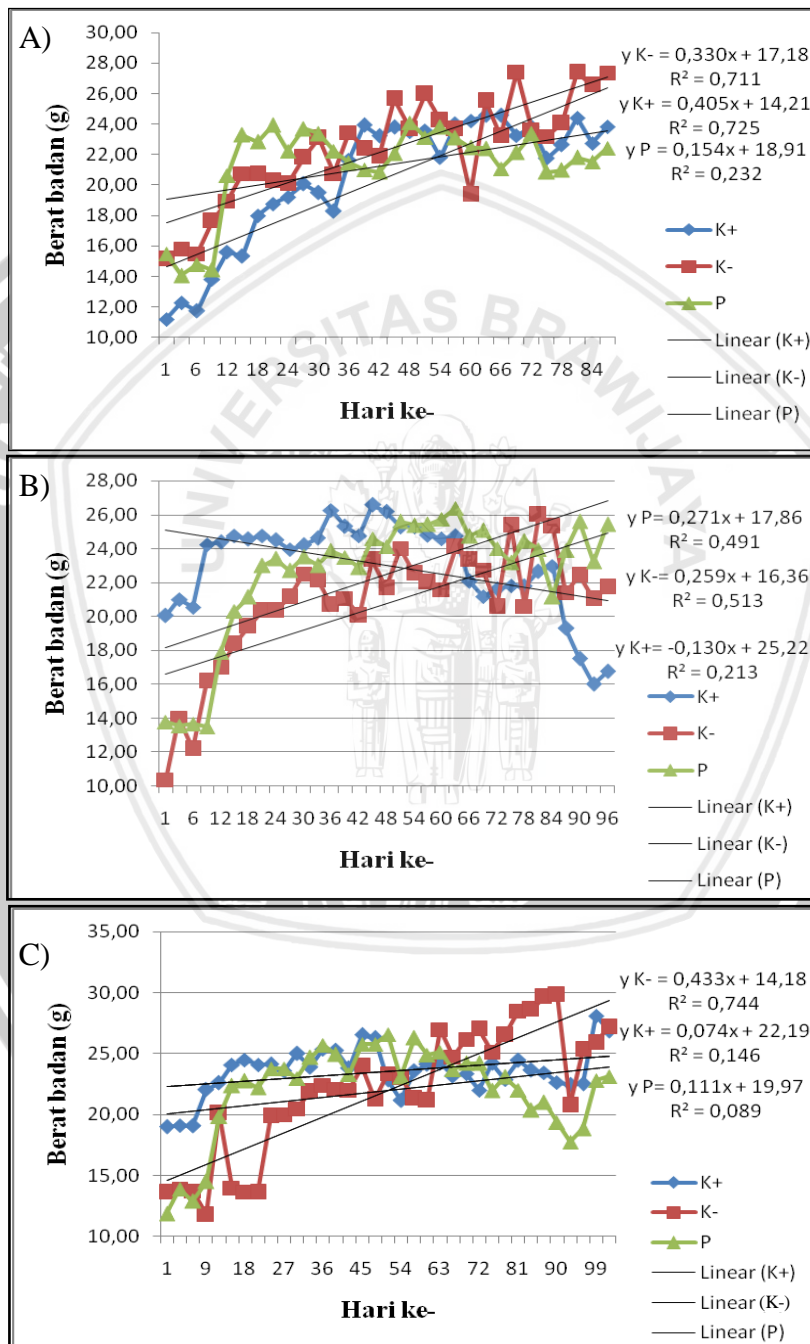
tubuh mencit pasca pemberian DMBA pada minggu ke-4. Kerontokan rambut tersebut disebabkan karena pemberian DMBA tidak hanya menimbulkan kanker payudara namun juga dapat menimbulkan kanker yang lain seperti kanker kulit yang ditandai dengan adanya kerontokan rambut mencit. Senyawa DMBA tergolong *indirect acting carcinogen* atau prokarsinogen yang memerlukan aktivasi metabolik (Ranasasmita, 2008).

Berdasarkan hasil pengamatan, sebagian besar mencit yang telah diinduksi DMBA dan estradiol menunjukkan adanya kerontokan rambut mencit. Selain itu, efek yang ditimbulkan yaitu adanya abnormalitas pada bagian perut mencit. Abnormalitas tersebut yaitu terjadinya pembesaran perut mencit (Gambar 8C). Hal tersebut dapat disebabkan oleh menumpuknya cairan pada rongga perut. Bidaah (2013) juga menyatakan bahwa terjadi kenaikan berat badan yang cukup tinggi dikarenakan adanya penumpukan cairan pada rongga perut (asites). Hal tersebut diduga bahwa terjadi gangguan pada hepar. Kerusakan hepar akan menyebabkan asites. Ketika hepar kehilangan kemampuannya membuat protein albumin, air menumpuk pada kaki (edema) dan abdomen (asites). Faktor utama asites adalah peningkatan tekanan hidrostatik pada kapiler usus (Price, 2005).

Berdasarkan hasil tabulasi berat badan mencit pasca induksi DMBA dan estradiol, menunjukkan bahwa terjadi perubahan pada mencit kanker. Jika  $y = a + bX$  maka dikatakan berat badan naik jika nilai  $b$  memiliki tanda  $+$ . Jika nilai  $R$  mendekati nilai 1 maka menunjukkan terdapatnya korelasi linier yang tinggi serta jika nilai  $R$  memiliki tanda positif ( $+$ ) maka terdapat korelasi positif (Harinaldi, 2005). Hasil analisis berat badan pada Minggu ke-10 (Gambar 9), menunjukkan bahwa mencit kelompok kanker (diinduksi DMBA dan Estradiol) hasil nilai  $R$  sebesar 0,725. Kelompok mencit normal (K-) memiliki nilai  $R$  sebesar 0,711 dan kelompok mencit yang diberi ekstrak *E.scaber* memiliki nilai  $R$  sebesar 0,232. Hasil nilai  $R$  ketiga kelompok tersebut memiliki korelasi yang positif diantara berat badan dan perlakuan karena menunjukkan hasil nilai yang positif. Namun pada kelompok mencit kanker (diinduksi DMBA dan Estradiol) dan kelompok mencit normal memiliki nilai laju kenaikan berat badan yang lebih tinggi dibandingkan kelompok mencit yang diberi ekstrak *E. scaber* karena mendekati nilai 1.

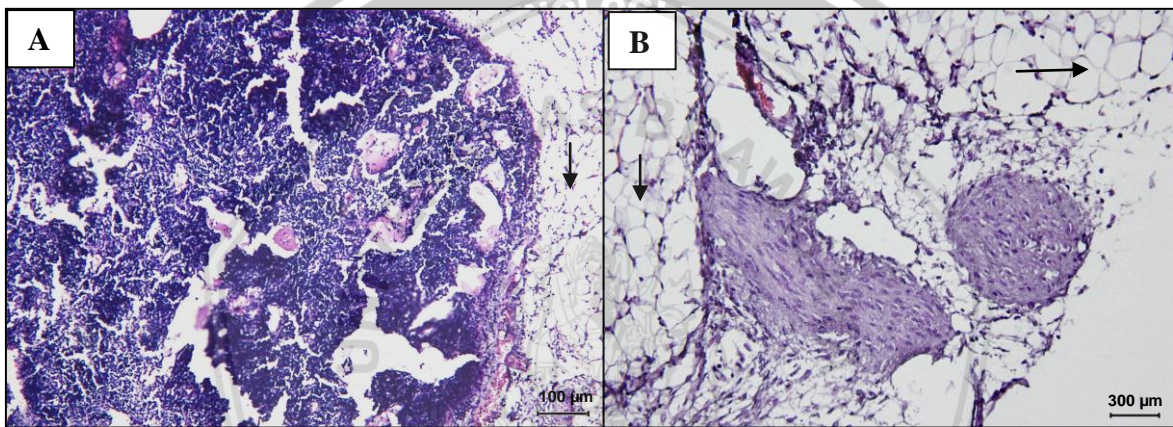
Hasil nilai  $R$  pada Minggu ke-11 (Gambar 9) juga menunjukkan adanya korelasi positif yang ditunjukkan dengan hasil nilai  $R$  yang positif. Pada kelompok kanker (induksi DMBA dan Estradiol) memiliki nilai  $R$  0,213, kelompok mencit normal memiliki nilai  $R$  sebesar 0,513, dan kelompok mencit yang diberi ekstrak *E. scaber* memiliki nilai  $R$  sebesar 0,491. Sehingga, pada minggu ke-11, kelompok mencit normal memiliki laju peningkatan berat badan lebih tinggi dibandingkan kelompok kanker dan pemberian ekstrak.

Berdasarkan hasil nilai R pada Minggu ke-12 (Gambar 9) memiliki hasil nilai R sebesar 0,146 pada kelompok mencit kanker (induksi DMBA dan Estradiol). Pada kelompok mencit normal, memiliki hasil nilai sebesar 0,744 dan pada kelompok perlakuan pemberian ekstrak *E. scaber* memiliki hasil nilai R sebesar 0,089. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada Minggu ke-12 kelompok mencit normal memiliki laju peningkatan berat badan yang lebih tinggi dibandingkan kelompok mencit kanker dan kelompok pemberian ekstrak.



**Gambar 9.** Berat badan mencit Minggu ke-10 (A), berat badan mencit Minggu ke-11 (B), Berat badan mencit Minggu ke-12 (C), ( K+ = mencit kanker (induksi DMBA + Estradiol); K- = mencit normal; P = mencit kanker yang diberi ekstrak *E.scaber* 50 mg/kg BB.

Berat badan pada kelompok pembedahan minggu ke-10, ke-11, dan ke-12 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan berat badan setiap harinya pada semua kelompok. Namun Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (pasca induksi DMBA dan estradiol), menunjukkan bahwa terjadi peningkatan berat badan. Hal tersebut berkebalikan dengan penelitian Rusmarilin (2008) bahwa terjadi penurunan berat badan pasca Induksi DMBA dan Estradiol. Namun pada penelitian Bidaah (2013), pasca induksi DMBA dan Estradiol terjadi peningkatan berat badan mencit. Hal tersebut disebabkan adanya penambahan berat dari cairan yang dihasilkan oleh proses asites. Hal tersebut juga terjadi dalam penelitian ini bahwa penambahan berat badan juga disebabkan oleh pembengkakan perut mencit.



**Gambar 10.** Histologi payudara menggunakan pewarnaan HE pada mencit kanker yang diinduksi DMBA dan Estradiol selama 8 minggu pada perbesaran 100x (A), pada mencit normal perbesaran 300x (B). Densitas sel yang tinggi menunjukkan tingkat proliferasi sel yang tinggi. (Arah panah menunjukkan sel Adiposit).

Berdasarkan hasil pengamatan histologi jaringan payudara mencit melalui pewarnaan H&E (Gambar 10), induksi DMBA dan estradiol dapat memicu terbentuknya kanker payudara atau tumor. Menurut Weigelt dkk. (2010), hal tersebut dapat dilihat dari densitas sel yang tinggi yang menandakan adanya proliferasi yang tinggi pada sel disekitarnya juga. Selain itu, tumor ditandai dengan terbentuknya neoplasma yang merupakan pertumbuhan sel yang abnormal yang dapat membentuk massa (Cooper, 1992; Dorland, 2012). Hasil pengamatan (Gambar 10) menunjukkan bahwa pada jaringan payudara, sel telah bercampur dan invasif sehingga jenis sel tidak dapat dibedakan. Sebagian jaringan payudara mencit telah bertransformasi menjadi lobular karsinoma yang berasal dari duktus lobulus. Namun duktus tidak dapat terlihat. Irisan preparat hanya menunjukkan sedikit bagian sel adiposit. Selvi (2015) menjelaskan bahwa sel karsinoma berbentuk bulat hingga

poligonal, nukleus dan sitoplasma tidak dapat dibedakan, epitel sel normal telah rusak oleh adanya proliferasi sel neoplastik diatas membran dasar.

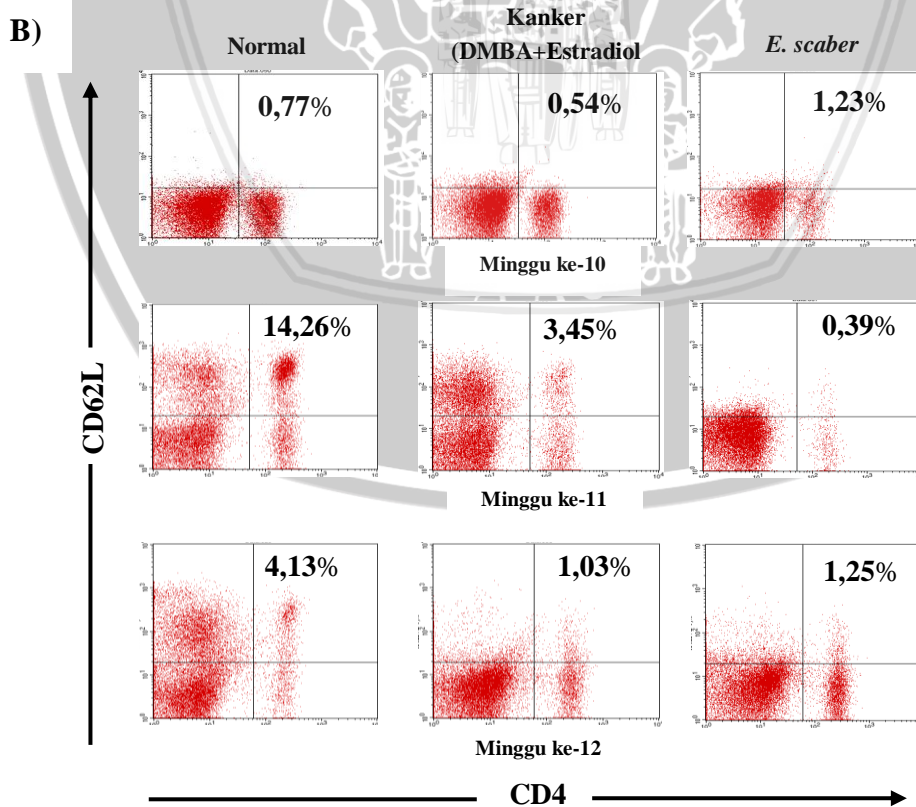
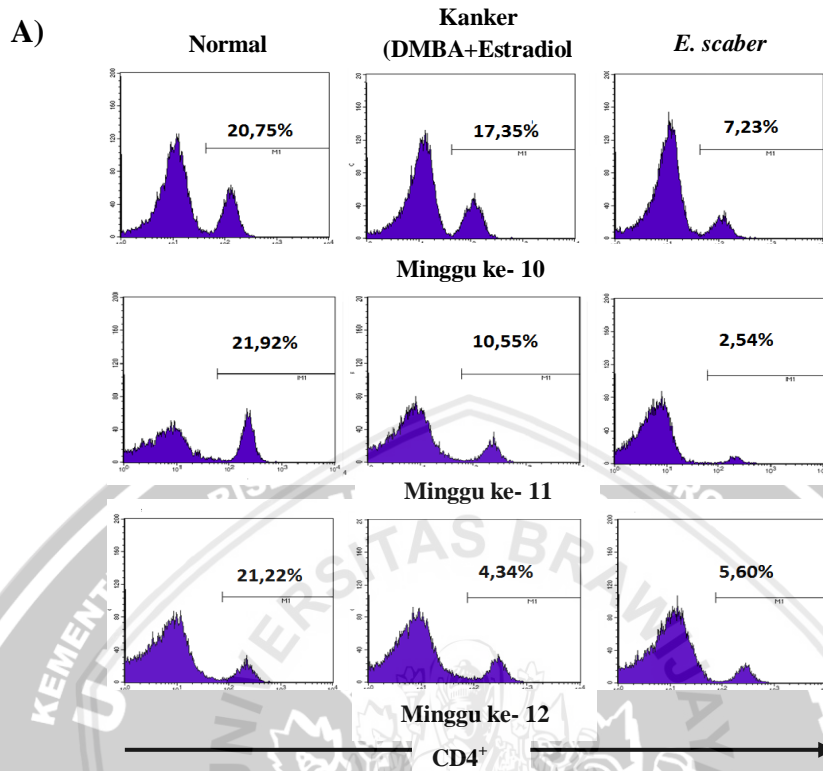
#### **4.2 Analisis Perubahan Profil Jumlah Total Sel T CD4<sup>+</sup> dan CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> pada Kelompok Mencit Normal, Mencit Kanker Induksi Senyawa DMBA dan Estradiol, serta Pemberian Ekstrak *E. scaber***

Berdasarkan hasil analisis flowcytometry sel T CD4<sup>+</sup> pada organ *spleen*, menunjukkan bahwa rata-rata lama pemberian ekstrak berpengaruh secara nyata untuk setiap kelompok perlakuan. Selain itu, terlihat bahwa *p-value* (<0.05) yang berarti rata-rata jumlah sel T CD4<sup>+</sup> pada setiap perlakuan berbeda secara nyata. Interaksi antara perlakuan dan lama pemberian ekstrak terlihat bahwa *p-value* (<0.05) yang berarti terdapat interaksi antara perlakuan dan lama pemberian ekstrak yang digunakan.

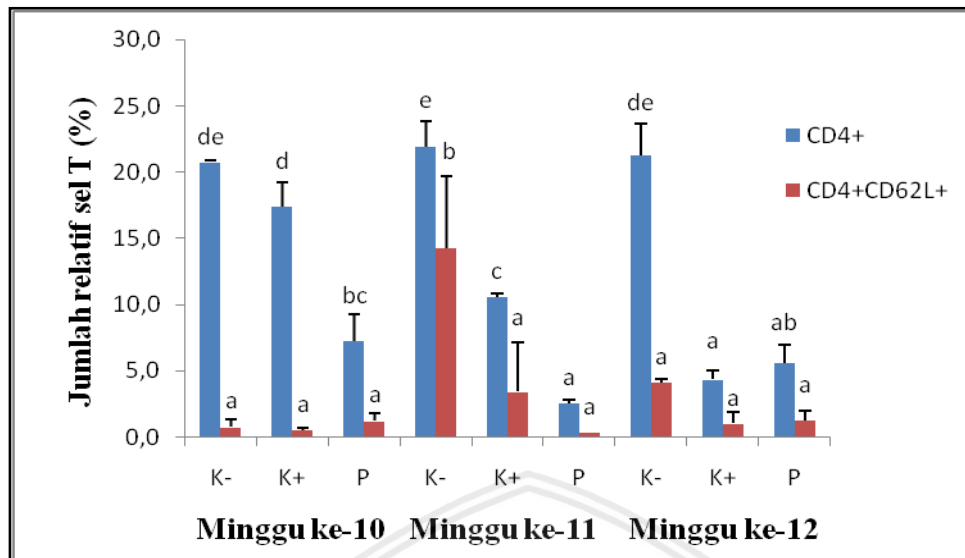
Hasil analisis *flowcytometry* sel T CD4<sup>+</sup> (Gambar 11A) setelah induksi DMBA dan estradiol menunjukkan bahwa terjadi penurunan pada kelompok kontrol positif (induksi karsinogen). Penurunan ini terjadi secara signifikan ( $p < 0,05$ ) pada setiap minggunya, dengan jumlah minggu pertama 17,34%, minggu ke-2 10,55% dan 4,34% pada minggu ke 3 (Gambar 11A). Hal tersebut dapat disebabkan karena pada minggu pertama, sistem imun dari mencit mengenali adanya benda asing yang masuk yaitu DMBA sehingga sistem imun dalam tubuh merespon dengan menghasilkan sel sel efektor seperti sel T CD4<sup>+</sup> tersebut. Namun penurunan pada minggu ke-2 dan ke-3 tersebut dapat disebabkan bahwa sistem imun dalam tubuh mencit terjadi recovery dengan sendirinya atau dapat dikatakan pemberian DMBA sudah tidak memiliki pengaruh dalam tubuh mencit. Hal tersebut berarti bahwa respon tubuh menurun atau tubuh berada dalam keadaan homeostatik. Menurut Oluboyo dkk. (2014), bahwa jumlah CD4<sup>+</sup> pada sel T pada subjek kanker payudara menurun secara signifikan ( $p < 0,05$ ). Selain itu, jumlah sel T CD4<sup>+</sup> di tahap akhir menunjukkan penurunan dengan tahap sebelumnya. Sel T CD4<sup>+</sup> berperan penting dalam pengembangan imunitas antitumor yang efektif dalam fungsi menghasilkan sitokin proinflamasi IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$  untuk mengaktifkan sel T sitotoksik. Sel T yang teraktivasi tersebut akan berfungsi dalam mengaktifkan sel T sitotoksik, makrofag, dan sel NK untuk mencegah pertumbuhan dari tumor melalui proses lisis.

Jumlah relatif CD4<sup>+</sup> pada kelompok kanker induksi DMBA memiliki jumlah yg lebih rendah dibandingkan dengan kelompok normal. Hal tersebut dapat disebabkan karena pada kondisi kanker terjadi ekskresi beberapa sitokin yang salah satunya adalah TGF-beta. Sitokin tersebut merupakan sitokin immunosupresif. Hal tersebut akan menyebabkan penekanan terhadap sel T efektor, sehingga CD4<sup>+</sup> yang berperan sebagai immunokompeten

menghasil sitokin IFN- $\gamma$  dan sel sitotoksik yang akan menghancurkan sel tumor akan semakin menurun dan tidak dapat meregulasi sistem imun seluler (Evans dkk., 2006).



C)



**Gambar 11.** Jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup> (%). A) Jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup>; B) Jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> menggunakan analisis *flowcytometry*; C) Diagram batang jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup> dan CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> (K<sup>-</sup> = mencit normal, K<sup>+</sup> = mencit kanker induksi DMBA dan estradiol, P = mencit kanker dan pemberian ekstrak *E. scaber* 50 mg/kg BB), Minggu 10 = pemberian ekstrak selama 1 minggu, Minggu 11= pemberian ekstrak selama 2 minggu dan, Minggu 12 = pemberian ekstrak selama 3 minggu. (subset berlaku untuk warna yang sama).

Pemberian ekstrak herbal pada mencit kanker dapat menekan jumlah sel T CD4<sup>+</sup>. Hal tersebut dapat dilihat dari jumlah relatif sel CD4<sup>+</sup> pada minggu pertama sebesar 7,23% dan pada minggu ke-2 dan ke-3 secara berturut-turut sebesar 2,54% dan 5,59%. Pemberian ekstrak selama 3 minggu tidak memberikan hasil yang signifikan jika dibandingkan dengan pemberian ekstrak selama 2 minggu, sehingga pemberian ekstrak selama 3 minggu tidak berpengaruh pada sel T CD4<sup>+</sup>. Menurut Yong Ho dkk. (2009), ekstrak *E. scaber* mengandung beberapa senyawa seperti flavonoid, saponin alkaloid, tanin, fenol, steroid, isodeoxyelephantopin, terpenoid, dan juga deoxyelephantopin. Cheeke (2000) menjelaskan bahwa senyawa saponin dan flavonoid berfungsi sebagai immunomodulator alami. Saponin dan flavonoid dapat meningkatkan respon imun terutama dalam meningkatkan jumlah sel imunokompeten seperti sel T CD4<sup>+</sup>. Namun hal tersebut tidak sebanding dengan hasil yang diperoleh pada kasus kanker payudara setelah pemberian DMBA dan estradiol. Hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa dalam ekstrak *E. scaber* belum mampu meningkatkan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> pada mencit setelah diinduksi DMBA dan estradiol untuk melawan sel tumor yang terbentuk. Namun menurut Marmi (2010), dosis ekstrak daun *E. scaber* yang terlalu tinggi dapat menekan jumlah sel T CD4<sup>+</sup>.

Pentingnya sel T CD4<sup>+</sup> sebagai imunitas antitumor dapat ditekankan dalam beberapa aspek. Pertama, gagasan awal adalah sel T CD4<sup>+</sup> memberikan bantuan untuk menginduksi

dan mempertahankan respon spesifik sel T sitotoksik CD8<sup>+</sup>. Kedua, Sel T CD4<sup>+</sup> dapat membantu untuk perkembangan dan pemeliharaan sel T memori CD8. Ketiga, sel T CD4<sup>+</sup> memediasi penolakan tumor melalui efek sitotoksik pada sel tumor, regulasi molekul MHC, antiangiogenesis, dan induksi lisis tumor (Yo-Ping dkk., 2011). Sehingga dalam hal ini, tumor yang terbentuk dalam tubuh mencit berkembang lebih pesat dibandingkan perlawanan sistem imun dalam tubuh.

Berdasarkan Tedder (1995), CD62L atau L selektin merupakan molekul adhesi yang memiliki fungsi perlekatan dan *rolling* pada sel endotel pembuluh darah. Molekul tersebut mampu diekspresikan oleh sel T naive CD4<sup>+</sup>CD62L atau CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>. Sel T naive ini akan mengalami sirkulasi di dalam darah dan *lymphnode* hingga terpapar antigen yang masuk dalam tubuh. Jika telah terpapar oleh antigen, maka sel T naive dalam tubuh normal orang sehat lebih dari 80%. Sedangkan pada individu tidak sehat sel T naive akan mengalami penurunan ekspresi CD62L pada organ *lymphnode* peripheral dan sel T akan teraktivasi.

Berdasarkan hasil analisa *flowcytometry* sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> (Gambar 11B) setelah dilakukan induksi DMBA dan estradiol menunjukkan tidak terdapatnya perbedaan yang nyata antar minggunya. Pada minggu ke-10, jumlah sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> mencapai 0,77% pada kontrol negatif (mencit normal), 0,54% pada kontrol positif (induksi DMBA dan estradiol), 1,23% pada perlakuan pemberian ekstrak *E. scaber* (Gambar 11B). Namun tidak terdapat perbedaan nyata antar sesamanya. Hal tersebut berbeda secara signifikan pada perlakuan minggu ke-11. Jumlah sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> pada kontrol negatif mencapai 14,26%, pada kontrol positif menunjukkan penurunan yang signifikan sebesar 3,45%, dan pada perlakuan ekstrak juga menunjukkan hasil penurunan yang signifikan dibandingkan kontrol negatif sebesar 0,39%. Minggu ke-12 juga menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan antar kelompoknya. Namun, pada minggu ke-10, minggu ke-11, dan minggu ke-12 terjadi penurunan jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> setelah diinjeksi DMBA dan Estradiol. Kontrol negatif memiliki jumlah sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> sebesar 4,13%, sedangkan pada kontrol positif menurun sebesar 1,03%, dan pada perlakuan ekstrak *E.scaber* sebesar 1,25%. Penurunan sel T yang mengekspresikan CD62L tersebut berarti bahwa induksi DMBA dan estradiol yang memicu diferensiasi sel T naive menjadi subset sel T CD4<sup>+</sup> atau dapat dikatakan terjadi aktivasi sel T CD4<sup>+</sup> (Jan dkk., 2007). Pemberian ekstrak *E. scaber* pada minggu ke-11 dan minggu ke-12 tidak mampu meningkatkan jumlah sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> (Gambar 11C). Hal tersebut menunjukkan bahwa terjadi



diferensiasi, dimana sel T CD4<sup>+</sup> banyak teraktivasi yang berperan sebagai sel efektor dalam merespon adanya zat karsinogen dari DMBA dan estradiol.

#### **4.3 Analisis Perubahan Profil Jumlah Total Sel T CD8<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> pada Kelompok Mencit Normal, Mencit Kanker Induksi Senyawa DMBA dan Estradiol, serta Pemberian Ekstrak *E. scaber***

Berdasarkan hasil analisis *flowcytometry* sel T CD8<sup>+</sup> pada organ *spleen*, menunjukkan bahwa rata-rata lama pemberian ekstrak berpengaruh secara nyata untuk setiap kelompok perlakuan. Selain itu, terlihat bahwa *p-value* (<0.05) yang berarti rata-rata jumlah sel T CD8<sup>+</sup> pada setiap perlakuan berbeda secara nyata. Interaksi antara perlakuan dan lama pemberian ekstrak terlihat bahwa *p-value* (<0.05) yang berarti terdapat interaksi antara perlakuan dan lama pemberian ekstrak yang digunakan.

Berdasarkan hasil analisis *flowcytometry* sel T CD8 pada organ *spleen* (Gambar 12A) menunjukkan bahwa kelompok mencit kanker yang diinduksi DMBA dan estradiol (kontrol positif) memiliki jumlah relatif sel sebesar 17,03% pada minggu pertama, 9,76% pada minggu kedua, dan 8,50% pada minggu ke-3 (Gambar 12A). Jumlah relatif sel T CD8<sup>+</sup> menunjukkan peningkatan pada minggu 1 dibandingkan dengan tikus sehat (kontrol negatif) (Gambar 12B). Peningkatan tersebut menunjukkan peningkatan signifikan dibandingkan dengan tikus sehat atau kontrol negatif. Namun, jumlah relatif sel T CD8<sup>+</sup> pada minggu ke-2 dan ke-3 menunjukkan penurunan jumlah sel T CD8<sup>+</sup> (Gambar 12B). Hal tersebut berarti bahwa sel T CD8 berfungsi sebagai sel T sitotoksik sehingga pada kondisi terbentuk kanker minggu pertama terjadi *self recovery* sehingga jumlah sel T CD8 meningkat untuk melawan sel kanker serta meregulasi sistem imun seluler dan humoral, seperti mengaktifkan limfosit Th2 untuk mensekresi sitokin yang akan menginduksi limfosit B menjadi sel plasma yang mampu mensekresi antibodi dan sel memori (Evans dkk., 2008). Penurunan jumlah sel T CD8<sup>+</sup> pada minggu ke-3 menunjukkan bahwa ada proses homeostasis dalam tubuh dalam menetralkan adanya benda asing yang masuk ke dalam tubuh.

Sel T CD8 memiliki fungsi khusus sebagai fungsi litik dan sebagian besar akan mengekspresikan MHC kelas I, tapi bukan molekul kelas II. Oleh karena itu, diyakini bahwa sel T CD8 adalah sel efektor utama yang bertanggung jawab dalam melisis sel tumor. Namun, sel T CD4 reaktif tumor dapat mengembangkan aktivitas sitotoksik dan memediasi penolakan tumor melalui pengenalan antigen MHC kelas II (Brown, 2010; Quezada dkk., 2010). Sel yang mengandung antigen tumor akan berikatan dengan MHC I.

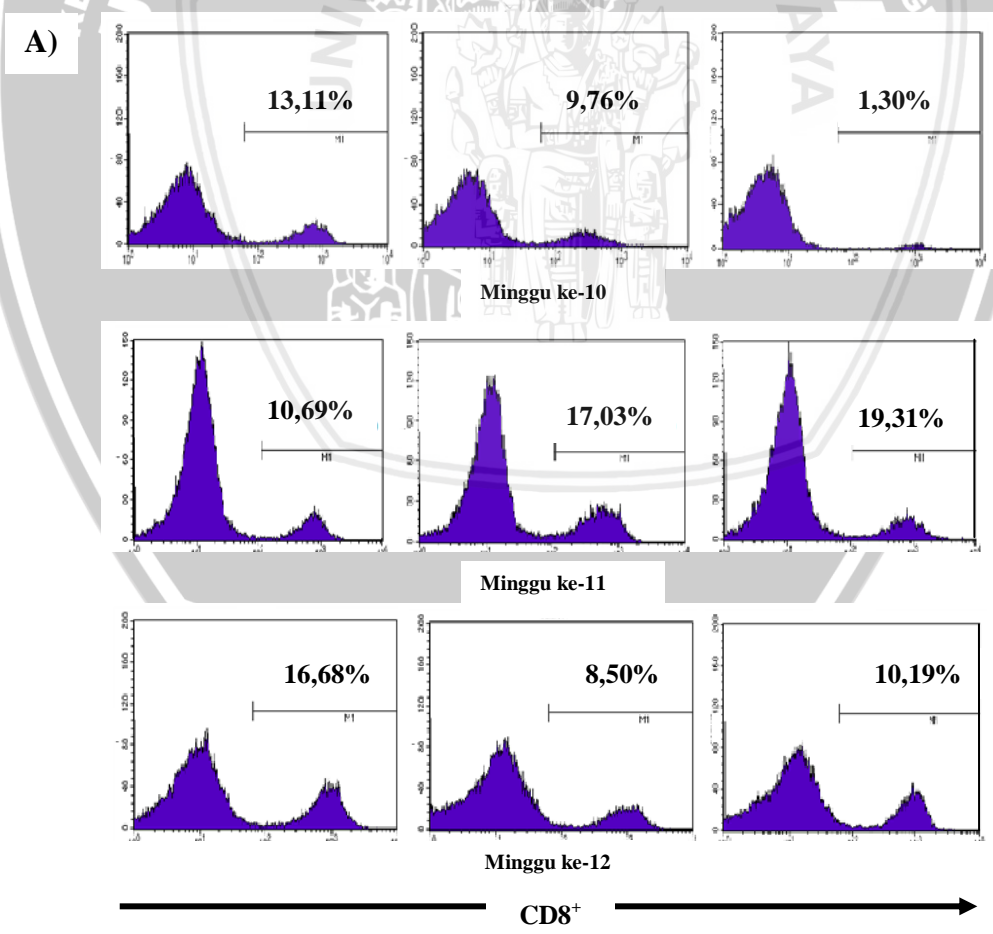
Hal tersebut akan membentuk kompleks melalui TCR (T Cell Receptor) dari sel T CD8 (sitotoksik) sehingga sel T CD8 teraktivasi dan akan berperan dalam lisis sel (Kaech dkk., 2002; Hung dkk., 2003). Menurut Oluboyo dkk. (2014), bahwa jumlah sel T CD8 pada subjek kanker payudara juga menurun secara signifikan ( $p < 0,05$ ). Selain itu, jumlah sel T CD8 pada tahap akhir menunjukkan penurunan dibandingkan dengan tahap sebelumnya.

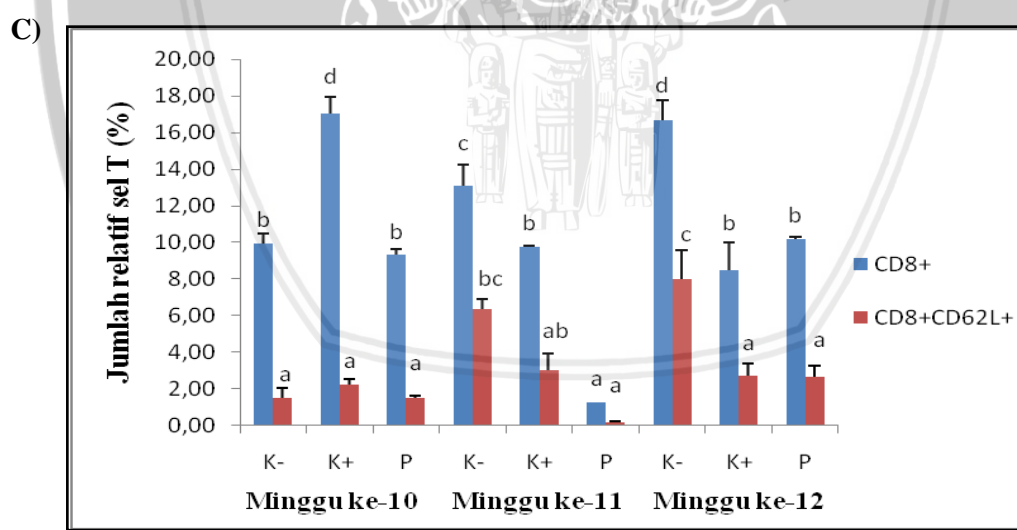
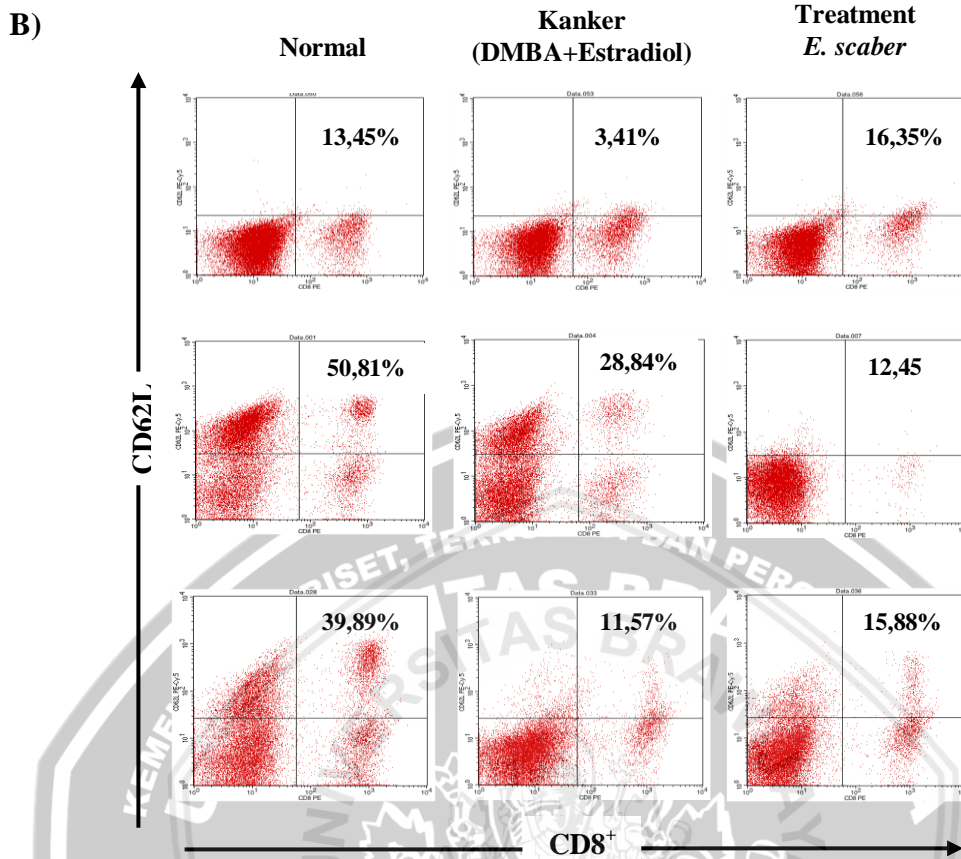
Kelompok mencit kanker yang diinduksi DMBA dan estradiol yang diberi perlakuan ekstrak *E. scaber* menunjukkan hasil penurunan secara signifikan ( $p < 0,05$ ) dibandingkan dengan mencit kanker (positif kontrol) minggu pertama dan minggu ke-2. Studi sebelumnya menunjukkan bahwa efek dari obat herbal *E. scaber* pada dosis 0,5 g/g BB dan 1,0 g/g BB dapat meningkatkan sel T CD8, namun jumlah sel T CD4 dan CD8 menurun pada dosis 2,0 g/g BB. Dosis rendah dapat menstimulasi proliferasi dari sel T, sedangkan pada dosis tinggi dapat mencegah proliferasi sel T (Djati dkk., 2015). Jumlah sel T CD4 dan CD8 pada penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak *E. scaber* berperan dalam immunosupresan pada jumlah sel T CD4 dan CD8 pada minggu ke-2. Hal tersebut disebabkan karena kandungan lupeol dan flavonoid yang berperan sebagai anti inflamasi. Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa efek herbal dapat menstimulasi atau sebaliknya menekan imunitas (Rahimi dkk., 2011 ; Djati dkk., 2015). Selain itu, Ichikawa (2006) juga menjelaskan bahwa rendahnya jumlah sel T CD8<sup>+</sup> pada mencit setelah diberikan ekstrak *E. scaber* kemungkinan disebabkan adanya kandungan berupa *isodeoxyelephantopin* pada daun tapak liman yang mampu meningkatkan jumlah sel T regulator sehingga menekan aktifitas sel-sel imunokompeten yang berlebihan di dalam tubuh.

Menurut Marmi (2010), Jumlah sel T CD4<sup>+</sup> menurun menyebabkan jumlah sel T CD8<sup>+</sup> juga akan menurun karena sel CD4<sup>+</sup> yang teraktivasi akan berkembang menjadi sel Th1 dan Th2. Selain itu, respon sel T CD8<sup>+</sup> akan meningkat dengan fungsi yang lebih optimal apabila jumlah sitokin proinflamasi yang dilepas sel limfosit T CD4<sup>+</sup> semakin banyak. Selain berfungsi mengaktifkan sel sel imunokompeten, sel Th1 yang telah aktif tersebut juga memproduksi sitokin seperti IFN $\gamma$  yang berperan untuk meningkatkan ekspresi MHC I yang akan dikenali sel T CD8<sup>+</sup> sehingga sel T CD8 naive dapat teraktivasi menjadi sel T efektor, maka dari itu jumlah sel T CD4<sup>+</sup> yang menurun akan menyebabkan sel T naive tidak mampu berdiferensiasi menjadi sel T CD8<sup>+</sup> efektor secara optimal.

Sel T CD8 merupakan mediator penting dalam imunitas tubuh terhadap sejumlah patogen, termasuk virus, parasit intraselular, dan bakteri, serta perlindungan kekebalan terhadap kanker. Respon induksi optimal sel T CD8 sangat penting untuk pertahanan kita

terhadap penyakit infeksi atau kanker. Limfosit T sitotoksik (CTLs) memainkan peran utama dalam penolakan tumor imunogenik. Respon imun seluler, proses penyajian protein antigen-presenting cells (APCs) dan fragmen peptida antigenik saat ini melalui kompleks MHC II ke sel T CD4. Sel CD4 yang diaktifkan membantu sel efektor melalui produksi sitokin (Kaech dkk., 2002; Hung dkk., 2003). Hasil jumlah sel T CD4 dan CD8 memiliki jumlah yang hampir sama dalam kasus kanker. Jumlah sel T CD4 pada minggu pertama memiliki jumlah sebesar 17,34%, sedangkan sel T CD8 sebesar 17,03%. Jumlah CD4 dalam minggu 2 10,55%, sedangkan pada CD8 9,76%. Jumlah CD4 pada minggu ke 3 sebesar 4,34%, sedangkan pada CD8 8,50%. Sel T CD4 memainkan peran penting dalam memfasilitasi aktivasi awal dan perkembangan sel T CD8. Selama sel T CD8 fase priming, sel T CD4 yang teraktivasi dapat membantu aktivasi CTL CD8. Sel T CD4 mengatur respons CTL CD8 antitumor melalui interaksi sel-sel langsung dan stimulasi IL-2. Sel T CD4 secara langsung dapat membantu aktivasi sel CD8 melalui interaksi CD40-CD154 (Mackey dkk., 1997; Mackey dkk., 1998; Bourgeois dkk., 2002).





**Gambar 12.** Jumlah relatif sel T CD8<sup>+</sup> pada (%). A) Jumlah relatif sel T CD8<sup>+</sup>; B) Jumlah relatif sel T CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> menggunakan analisis *flowcytometry*; C) Diagram batang jumlah relatif sel T CD8<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> (K- = mencit normal, K<sup>+</sup> = mencit kanker induksi DMBA dan estradiol, P = mencit kanker dan pemberian ekstrak *E. scaber* 50 mg/kg BB), Minggu 10 = pemberian ekstrak selama 1 minggu, Minggu 11= pemberian ekstrak selama 2 minggu dan, Minggu 12 = pemberian ekstrak selama 3 minggu. (subset berlaku untuk warna yang sama).

Berdasarkan hasil analisis statistik menggunakan uji Tukey, tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada jumlah relatif (%) CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> berdasarkan kelompok perlakuan

pada minggu ke-10 secara signifikan ( $p < 0,05$ ) (Gambar 12B). Kelompok kontrol negatif (mencit normal) memiliki jumlah relatif sel sebesar 1,52%, kelompok kontrol positif (kanker induksi DMBA dan estradiol) memiliki jumlah relatif sel sebesar 2,26%, dan jumlah relatif sel kelompok pemberian ekstrak *E. scaber* sebesar 1,50%. Sedangkan pada minggu kedua terjadi penurunan antara kelompok kontrol negatif (normal) 6,37% dengan kelompok kontrol positif (kanker induksi DMBA dan estradiol) 3,02% namun tidak menunjukkan penurunan yang signifikan. Pemberian senyawa karsinogen DMBA dan estradiol selama 2 minggu pada kelompok minggu ke-11, menunjukkan hasil penurunan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) sebesar 0,05% dibandingkan kelompok kontrol negatif sebesar 1,17%. Kelompok perlakuan minggu ke-12 menunjukkan penurunan yang signifikan antara kelompok kontrol negatif dengan jumlah relatif sel sebesar 8,03% dengan kelompok kontrol positif dengan nilai relatif sel sebesar 2,73% dan perlakuan pemberian ekstrak *E. scaber* dengan nilai relatif sel sebesar 2,66%. Penurunan tersebut dapat berakibat pada menurunnya jumlah sel T naive karena sel T CD62L berfungsi sebagai mediator sel T naive menuju organ limfoid perifer tempat antigen dan inisiasi respon imun. Pemberian ekstrak *E. scaber* pada minggu ke-10, ke-11, dan ke-12 tidak memberikan perbedaan yang signifikan berdasarkan kelompok perlakuan dan waktu (Gambar 12C). Kelompok perlakuan minggu ke-11 dan minggu ke-12 pada kelompok kontrol positif dan perlakuan sama-sama terjadi penurunan jumlah relatif sel T secara signifikan. Hal tersebut dapat diduga bahwa pada saat terdapat paparan zat karsinogen terdapat banyak sel T CD8<sup>+</sup> yang teraktivasi sehingga banyak sel T CD8<sup>+</sup> yang kehilangan molekul CD62L.

Sel T naive CD62L merupakan sel yang belum pernah terpapar antigen dan kurang reaktif terhadap antigen yang masuk ke dalam tubuh. Jumlah sel T naive dan sel T teraktivasi pada penelitian ini memiliki hubungan berkebalikan. Ketika jumlah sel T teraktivasi menurun maka jumlah sel T naive lebih banyak begitu pula sebaliknya. Jumlah sel T CD62L akan berkurang seiring dengan meningkatnya jumlah sel T CD8<sup>+</sup> yang teraktivasi. Menurut Jan dkk. (2007), CD62L merupakan marker aktivasi sel dan berfungsi sebagai mediator sel T naive menuju organ limfoid perifer tempat antigen dan inisiasi respon imun, sehingga penurunan jumlah sel T CD62L mengindikasikan aktivasi sel T naive menjadi sel T CD8<sup>+</sup>.

Penurunan CD62L pada penelitian menunjukkan bahwa menurunnya jumlah relatif sel CD4<sup>+</sup> yang mengaktifkan Th 1 dan Th 2 akan berdampak pula pada penurunan CD8<sup>+</sup> karena sel Th1 akan mensintesis sitokin IL2 yang akan meningkatkan sel imunokompeten seperti CD8<sup>+</sup>. Selain berfungsi mengaktifkan sel sel imunokompeten, sel Th1 yang telah

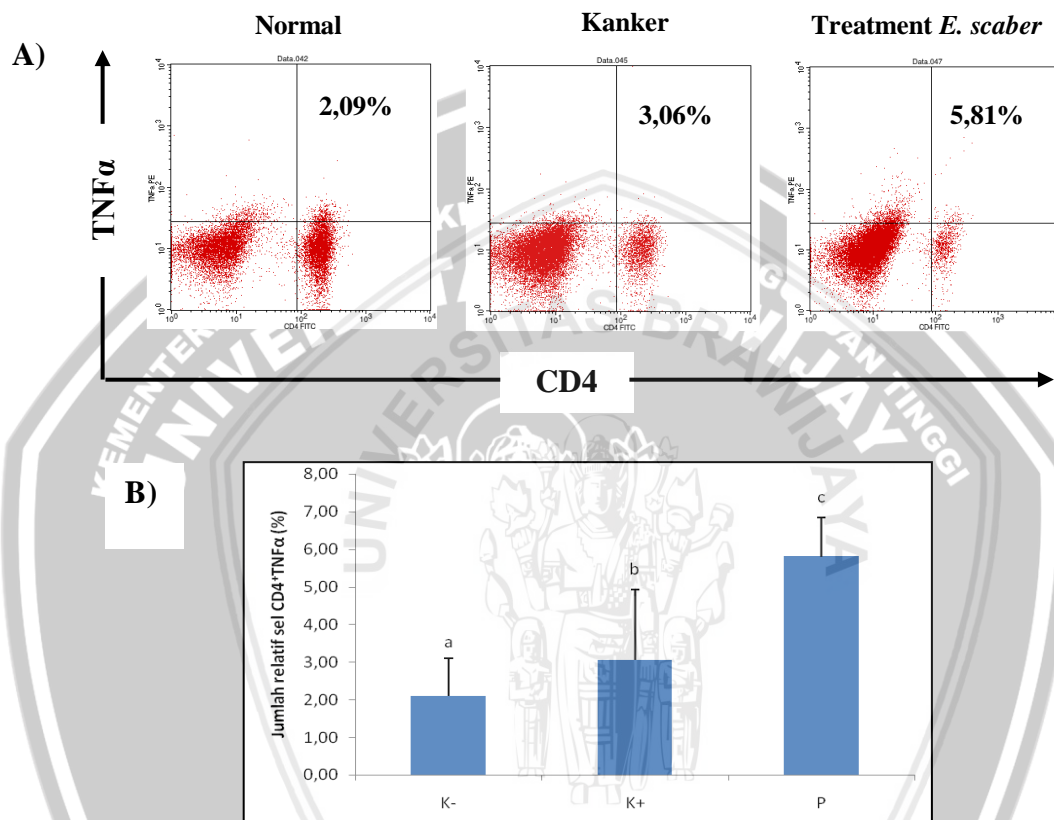
aktif tersebut juga memproduksi sitokin seperti IFN $\gamma$  yang berperan untuk meningkatkan ekspresi MHC I yang akan dikenali sel T CD8<sup>+</sup> sehingga sel T CD8 naive dapat teraktivasi menjadi sel T efektor, maka dari itu jumlah sel T CD4<sup>+</sup> yang menurun akan menyebabkan sel T naive tidak mampu berdiferensiasi menjadi sel T CD8<sup>+</sup> efektor secara optimal (Baratawijaya dan Iris, 2010).

#### **4.4 Analisis Perubahan Profil Jumlah Total Sel T CD4<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> pada Kelompok Mencit Normal, Mencit Kanker Induksi Senyawa DMBA dan Estradiol, serta Pemberian Ekstrak *E. scaber***

TNF- $\alpha$  merupakan sitokin pleiotropik yang diproduksi oleh berbagai sel berinti dalam tubuh. TNF- $\alpha$  adalah agen proinflamasi yang akan meregulasi makrofag untuk merespon trauma, infeksi, dan stres sel seperti tumor. Namun, fungsi utama TNF- $\alpha$  adalah sebagai mediator dalam memproduksi sitokin proinflamasi lainnya seperti IL-1 dan IL-6 (Shi dkk., 2005). Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat dilihat bahwa jumlah relatif sel rata-rata kelompok mencit normal (K-) menunjukkan hasil yang lebih rendah dibandingkan kelompok mencit kanker induksi DMBA dan estradiol (Gambar 13B). Sehingga dalam hal ini, jumlah TNF- $\alpha$  pada mencit kontrol negatif (K-) lebih rendah dibandingkan mencit kanker dan perlakuan dikarenakan adanya kanker akan menyebabkan teraktivasinya CD4<sup>+</sup> dalam melisis sel tumor sehingga jumlah TNF- $\alpha$  yang teraktivasi juga tinggi. Begitu juga dengan kelompok perlakuan pemberian ekstrak *E.scaber* yang memiliki perbedaan signifikan dibandingkan kelompok normal (K-), kelompok mencit kanker yang diinduksi DMBA dan estradiol (K+) memiliki jumlah sebesar 3,06% dan berbeda nyata dengan kelompok normal 2,09% (Gambar 13A). TNF- $\alpha$  adalah jenis sitokin yang diproduksi akibat teraktivasinya sel CD4<sup>+</sup> atau makrofag (Van Horseen dkk., 2006). Menurut Kumar dkk. (2013), peningkatan kadar TNF- $\alpha$  berhubungan dengan peningkatan jumlah makrofag dan sel fagosit untuk melakukan proses fagositosis dalam mempertahankan tubuh dari serangan benda asing.

Pemberian perlakuan ekstrak *E. scaber* pada mencit kanker yang diinduksi DMBA dan estradiol menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) sebesar 5,81% dibandingkan kelompok normal dan kontrol positif (kanker induksi DMBA dan estradiol). Angka yang tinggi tersebut berarti bahwa kandungan zat aktif dalam ekstrak *E. scaber* dapat meningkatkan sistem imunitas tubuh untuk aktif memproteksi tubuh serta adanya perbaikan jaringan setelah paparan DMBA (Rahman, 2016). TNF- $\alpha$  bersifat sitotoksin bagi banyak jenis sel tumor dan mampu memicu transduksi sinyal cascade, seperti pada proses

apoptosis, menstimulus NF-kB dan aktivasi p38 MAPK, ERK, JNK. Penempelan TNF- $\alpha$  pada TNFR1 akan mengaktifkan protein adapter TNFR-associated death domain (TRADD). Protein ini akan berinteraksi dengan domain cytopathic death pada TNFR1 melalui death domain. dan mengaktifkan proses apoptosis melalui jalur caspase (Herbein & O'Brien 2000; Aggarwal dkk., 2012). Dari sini dapat dilihat bahwa TNF- $\alpha$  memiliki hubungan yang kuat dengan tingkat insidensi tumor.

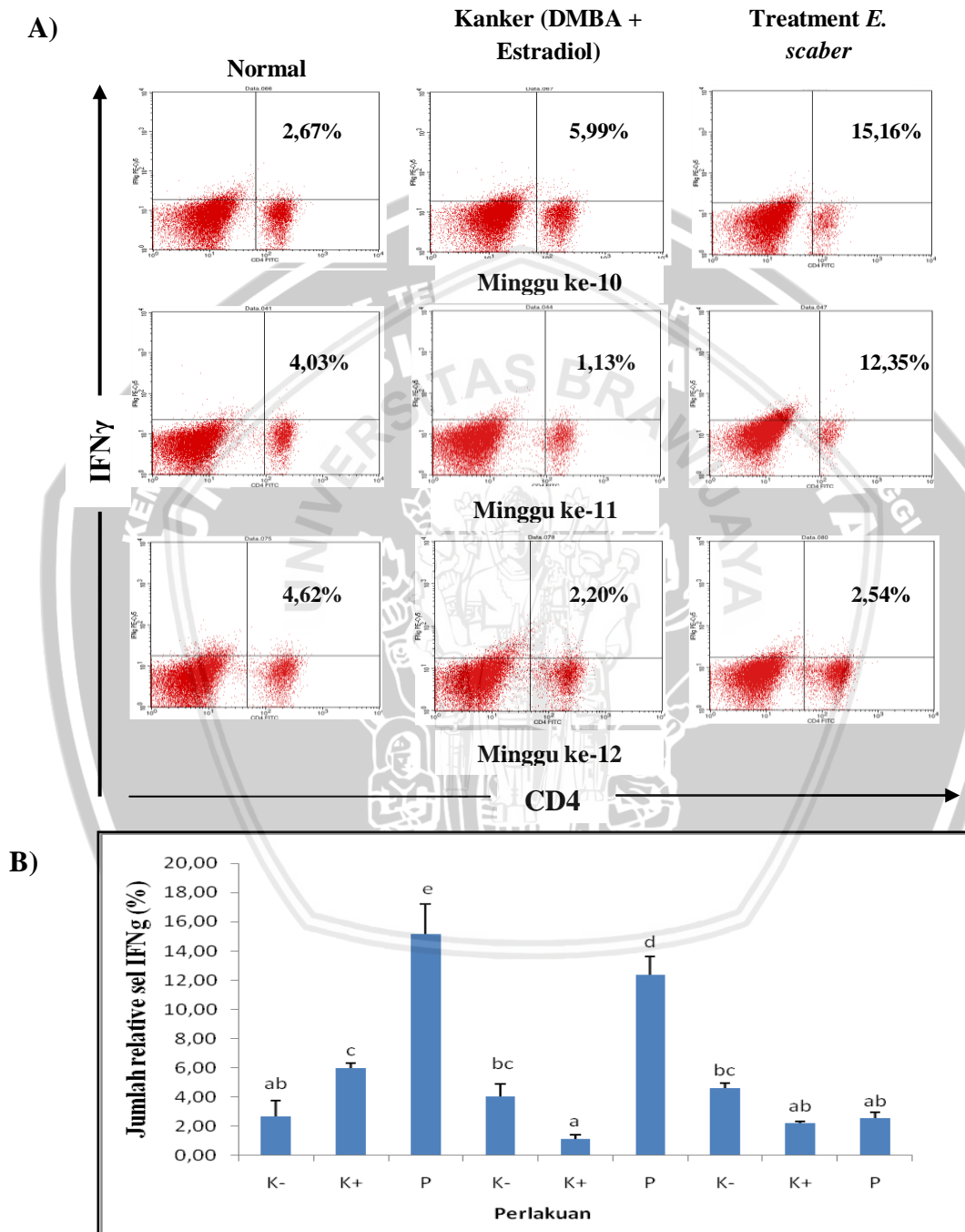


**Gambar 13.** Jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup> (%) A) Jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup> menggunakan analisis *flowcytometry*. B) Diagram batang jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup>. (K- = mencit normal, K<sup>+</sup> = mencit kanker induksi DMBA dan estradiol, P = mencit kanker dan pemberian ekstrak *E. scaber* 50 mg/kg BB).

#### 4.5 Analisis Perubahan Profil Jumlah Total Sel T CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> pada Kelompok Mencit Normal, Mencit Kanker Induksi Senyawa DMBA dan Estradiol, serta Pemberian Ekstrak *E. scaber*

Sitokin proinflamasi IFN- $\gamma$  adalah sitokin yang diekspresikan dan disintesis oleh *NK cell*. Interferon juga berperan dalam meningkatkan sekaligus menghambat fungsi sel. Fungsi penghambat, berperan dalam memperlambat pertumbuhan sel normal dan sel neoplastic. Fungsi peningkatan yaitu dalam kemampuannya untuk mengaktifkan makrofag untuk membunuh bakteri dengan cara aktivasi makrofag. Sitokin tersebut akan mengaktifkan makrofag dalam memfagositasi patogen secara efektif. Selain itu, sitokin

IFN- $\gamma$  tersebut akan menstimulasi respon beberapa antibodi. Sitokin IFN- $\gamma$  berperan dalam proinflamasi dan berperan penting dalam induksi imunitas tipe I. Keberadaan sitokin tersebut digunakan untuk mengukur ketahanan sistem imunitas tubuh. (Abbas dkk., 2016; Lee dkk., 2007).



**Gambar 14.** Jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (%) A) Jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> menggunakan analisis *flowcytometry*. B) Diagram batang jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. (K- = mencit normal, K<sup>+</sup> = mencit kanker induksi DMBA dan estradiol, P = mencit kanker dan pemberian ekstrak *E. scaber* 50 mg/kg BB), Minggu 10 = pemberian ekstrak selama 1 minggu, Minggu 11 = pemberian ekstrak selama 2 minggu dan, Minggu 12 = pemberian ekstrak selama 3 minggu.



Berdasarkan hasil penelitian, menunjukkan bahwa ekstrak *E. scaber* dapat meningkatkan jumlah relatif sel  $CD4^+IFN-\gamma^+$  secara signifikan ( $p < 0,05$ ) pada minggu pertama (15,16%) dan kedua (12,35%) (Gambar 14). Mencit normal memiliki jumlah relatif sel  $CD4^+IFN-\gamma^+$  yang tidak berbeda nyata. Artinya jumlah relatif sel  $CD4^+IFN-\gamma^+$  pada minggu ke-1, minggu ke-2, dan minggu ke-3 memiliki hasil yang sama. Jika dibandingkan dengan mencit kanker yang diinduksi DMBA dan estradiol, mencit normal memiliki perbedaan signifikan pada minggu pertama (5,99%), minggu ke-2 (1,13%), dan minggu ke-3 (2,20%) (Gambar 14B). Namun, pada minggu pertama, mencit yang diinduksi DMBA dan estradiol memiliki jumlah relatif sel lebih tinggi secara signifikan ( $p < 0,05$ ) dibandingkan dengan minggu ke-2 dan ke-3. Hal tersebut menunjukkan bahwa terjadi *self recovery* pada mencit kanker yang diinjeksi DMBA dan estradiol minggu pertama. Namun, pada minggu ke-2 dan ke-3, terjadi penurunan jumlah relatif sel  $CD4^+IFN-\gamma^+$  yang menunjukkan bahwa tidak adanya pertahanan tubuh untuk menghambat proses karsinogen DMBA dan estradiol.

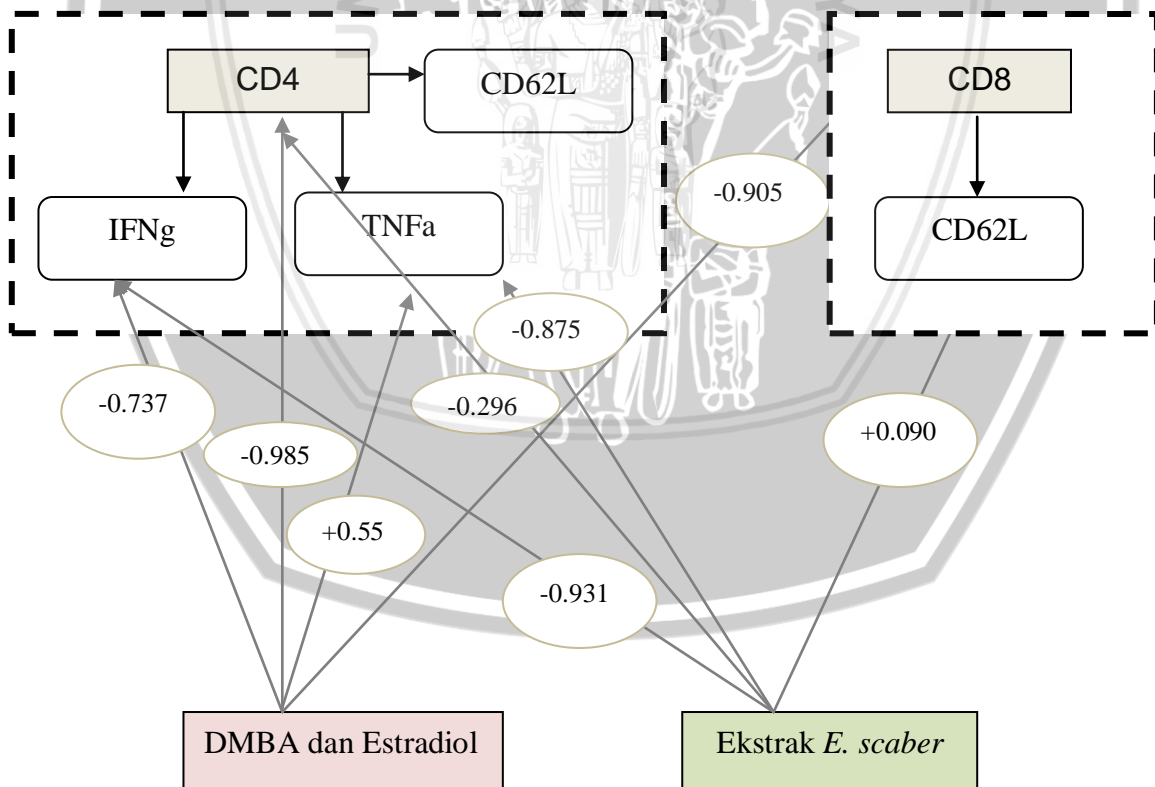
Pemberian ekstrak *E. scaber* juga menunjukkan penurunan secara signifikan setiap minggunya. Hal tersebut berarti bahwa pada minggu pertama, jumlah sitokin  $IFN-\gamma$  mengalami kenaikan yang berarti bahwa pemberian ekstrak *E. scaber* mampu meningkatkan jumlah  $IFN-\gamma$  untuk mengaktifkan makrofag. Sedangkan pada minggu kedua dan ketiga yang semakin menurun berarti bahwa ekstrak *E. scaber* belum mampu mempertahankan jumlah  $IFN-\gamma$  karena sifat zat karsinogen di dalam tubuh mencit semakin tinggi sehingga terjadi penurunan  $IFN-\gamma$ . Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif atau mencit yang terpapar DMBA dan estradiol pada minggu ke-2, menunjukkan peningkatan yang signifikan (12,35%). Namun pada minggu ke-3 antara perlakuan pemberian DMBA dan estradiol (2,20%) dengan pemberian ekstrak tidak menunjukkan perbedaan yang nyata (2,54%). Hal tersebut berarti bahwa sifat karsinogen zat pada tubuh mencit tidak dapat dikendalikan oleh sistem imunitas tubuh.

Pada kondisi normal, tubuh tidak merespon sehingga jumlah sitokin  $IFN-\gamma$  mengalami penurunan. Pada kondisi adanya paparan zat karsinogen DMBA dan estrogen, tubuh memiliki *self recovery* untuk melawan zat karsinogen tersebut. Pemberian ekstrak *E. scaber* dapat meningkatkan jumlah  $IFN-\gamma^+$ , dimana  $IFN-\gamma$  dapat menghambat karsinogenesis pada mencit setelah induksi DMBA dan estradiol (Abbas dkk., 2005). Aktivitas  $IFN-\gamma$  antara lain sebagai aktivator sel makrofag dan CTL dalam anti tumor,

meningkatkan fungsi sel NK sebagai sel efektor yang poten dalam melisis sel kanker, dan mengontrol regulasi limfosit B dalam respon imun. Aktivasi makrofag oleh IFN- $\gamma$ , akan mensekresi sitokin aktivator yaitu IFN- $\gamma$  dimana sitokin ini akan mengaktifkan sel CTL dan sel NK, dimana CTL dan sel NK akan membunuh sel kanker melalui jalur Fas-Ligand kemudian mengaktifasi FADD, adanya aktivitas FADD ini akan memicu aktivitas kaskade-kaspase, dimana kaspase yang aktif akan mengaktifkan DNA-se yang kemudian memfragmentasi DNA sel kanker, sehingga sel kanker mengalami kematian (apoptosis) (Ilyas, 2014).

#### 4.6 Pengaruh Induksi Senyawa Karsinogen (DMBA dan Estradiol) dan Pemberian Ekstrak *Elephantopus scaber* terhadap fluktuasi CD4, CD4CD62L, CD8, CD8CD62L, TNF- $\alpha$ , dan IFN- $\gamma$

Pengujian signifikansi digunakan untuk menguji hipotesis mengenai ada tidaknya pengaruh dari setiap variabel secara parsial. Kriteria pengujian menyatakan bahwa apabila nilai probabilitas < *level of significant* ( $\alpha = \alpha$ ) maka dinyatakan adanya pengaruh variabel secara parsial.



**Gambar 15.** Diagram analisis path pengaruh induksi kanker dengan DMBA dan Estradiol dan pemberian ekstrak *E. scaber* terhadap fluktuasi CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ .

Pengaruh induksi senyawa karsinogen terhadap CD4 menghasilkan nilai T statistik sebesar 0,328 dengan probabilitas 0,753. Hasil pengujian tersebut menunjukkan bahwa probabilitas  $>$  alpha (5%). Hal tersebut berarti pengaruh senyawa karsinogen dapat menurunkan jumlah CD4 sebesar -0,985. Sehingga dapat diartikan bahwa ketika pembedahan pada senyawa karsinogen naik 1 hari maka cenderung dapat menurunkan CD4 sebesar 98,5% (Gambar 15).

Pengaruh induksi senyawa karsinogen terhadap CD8 menghasilkan nilai T statistics sebesar -5,621 dengan probabilitas sebesar 0,01. Hasil menunjukkan bahwa probabilitas  $<$  alpha (5%). Koefisien pengaruh senyawa karsinogen terhadap CD8 sebesar -0,905. Dengan demikian dapat diartikan, ketika pembedahan pada senyawa karsinogen naik 1 hari maka cenderung dapat menurunkan CD8 sebesar 90,5% (Gambar 15).

Pengaruh induksi senyawa karsinogen terhadap TNF- $\alpha$  menghasilkan nilai T statistics sebesar 1,766 dengan probabilitas sebesar 0,121. Hasil menunjukkan bahwa probabilitas  $>$  alpha (5%). Koefisien pengaruh senyawa karsinogen terhadap TNF- $\alpha$  sebesar 0,555. Hal ini menunjukkan bahwa ketika pembedahan pada senyawa karsinogen naik 1 hari maka cenderung dapat meningkatkan CD8 sebesar 55,5% (Gambar 15).

Pengaruh induksi senyawa karsinogen terhadap IFN- $\gamma$ . menghasilkan nilai T statistics sebesar -2,886 dengan probabilitas sebesar 0,23. Hasil menunjukkan bahwa probabilitas  $>$  alpha (5%). Koefisien pengaruh senyawa karsinogen terhadap TNF- $\alpha$  sebesar -0,737. Hal ini menunjukkan bahwa ketika pembedahan pada senyawa karsinogen naik 1 hari maka cenderung dapat menurunkan IFN- $\gamma$ . sebesar 73,7% (Gambar 15).

Pengaruh pemberian ekstrak *E. scaber* terhadap CD4 menghasilkan nilai T statistics sebesar -0,820 dengan probabilitas 0,439. Hasil pengujian tersebut menunjukkan bahwa probabilitas  $>$  alpha (5%). Koefisien pengaruh pemberian ekstrak *E. scaber* terhadap CD4 sebesar -0,296. Hal ini menunjukkan bahwa ketika pembedahan pada senyawa karsinogen naik 1 hari maka cenderung dapat menurunkan CD4 sebesar 29,6% (Gambar 15).

Pengaruh pemberian ekstrak *E. scaber* terhadap CD8 menghasilkan nilai T statistics sebesar 0,238 dengan probabilitas 0,818. Hasil pengujian tersebut menunjukkan bahwa probabilitas  $>$  alpha (5%). Koefisien pengaruh pemberian ekstrak *E. scaber* terhadap CD8 sebesar 0,090. Hal ini menunjukkan bahwa ketika pembedahan pada senyawa karsinogen naik 1 hari maka cenderung dapat meningkatkan CD8 sebesar 9,0% (Gambar 15).

Pengaruh pemberian ekstrak *E. scaber* terhadap TNF- $\alpha$  menghasilkan nilai T statistik sebesar -4,783 dengan probabilitas 0,002. Hasil pengujian tersebut menunjukkan bahwa probabilitas  $<$  alpha (5%). Koefisien pengaruh pemberian ekstrak *E. scaber* terhadap TNF-



berperan secara efektif yaitu sel sitotoksik. Sel sitotoksik dalam hal ini yaitu sel T CD8<sup>+</sup>. Sel T CD8<sup>+</sup> mengenal peptida antigen dalam sel terinfeksi melalui kompleks dengan MHC I. Aktivasi sel T sitotoksik akan meningkatkan ekspresi Fas Ligan pada permukaan sel kanker. Protein Fas pada membran CD8<sup>+</sup> akan bereaksi dengan Fas Ligan pada membran sel sasaran dan akan menginisiasi proses terjadinya apoptosis (Brown, 2010).

Selain sel T sitotoksik, makrofag juga merupakan sel sitotoksik yang dapat mensekresikan berbagai sitokin yang dapat direspon oleh sistem imun untuk melawan sel tumor. Makrofag akan mensekresikan TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  merupakan sitokin pro-inflamasi yang dapat menyebabkan apoptosis untuk menginduksi kematian sel tumor. Sel tumor yang telah dicerna oleh makrofag akan dipresentasikan ke sel T CD4<sup>+</sup>. Sel T CD4<sup>+</sup> yang berproliferasi dan berdiferensiasi, berkembang menjadi subset Th1. Subset Th1 akan menyebabkan aktivasi sitokin TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$  sehingga akan menginisiasi terjadinya apoptosis sel (Evans dkk., 2006) (Gambar 16).

*Elephantopus scaber* memiliki beberapa kandungan senyawa etanol diantaranya saponin dan flavonoid dimana kedua senyawa ini berkontribusi dalam proliferasi sel yang mampu untuk menginduksi sintesis protoonkogen C-fos dan c-myc. Protoonkogen pada proliferasi sel akan meningkatkan sinyal transduksi mitogen melalui peningkatan ekspresi sitokin IL-2. Selain itu flavonoid dapat meningkatkan aktivitas IL-2 dan proliferasi limfosit (Liang dkk., 2008). IL-2 dapat memicu aktivasi CD8 untuk menghasilkan perforin dan granzyme yang akan menghancurkan sel yang terinfeksi (Nally dkk., 2011). Selain itu tingginya kandungan senyawa flavonoid dan alkaloid dalam *E. scaber* memungkinkan tanaman ini berfungsi sebagai antioksidan yang mampu mengendalikan aktivitas NO (Nitric oxide). Flavonoid juga memiliki kemampuan untuk memicu aktivitas MAPK yang dapat merangsang peningkatan IL-2. IL-2 adalah faktor pertumbuhan sel imunokompeten yang dapat meningkatkan konsentrasi cyclin D2, E, dan A, yang memainkan peran penting dalam siklus sel. Setelah melewati fase S, pengikatan cyclin A akan mengikat Cdk1 untuk mengatur transisi sel dari S ke G1. Kompleks Cyclin A-Cdk1 menyebabkan kondensasi kromatin yang diperlukan untuk pembelahan sel. Hal ini menyebabkan sel imunokompeten, terutama sel T CD4<sup>+</sup> berproliferasi secara aktif (Dhulipala dkk., 2006).

Sel T CD4<sup>+</sup> yang pernah diaktifkan oleh IL-2 akan berproliferasi dan menghasilkan IFN- $\gamma$ , sehingga jumlah sitokin IFN- $\gamma$  akan meningkat. Selain itu sitokin IFN- $\gamma$  juga akan menstimulasi sel T untuk berdiferensiasi menjadi sel T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$  yang dapat menstimulasi pengaturan ekspresi MHC-II sehingga sel T naive akan berdiferensiasi menjadi sel T CD4<sup>+</sup>. Sitokin IFN- $\gamma$  akan menstimulasi makrofag untuk mengontrol sel

kanker. IFN-  $\gamma$  dapat menstimulasi proses fagositosis dan membunuh mikroba intaseluler. Peningkatan IFN-  $\gamma$  tidak hanya disebabkan oleh IL-2 tetapi juga saponin yang terkandung dalam *E. scaber*. Saponin memiliki kemampuan untuk meningkatkan sitokin IFN-  $\gamma$ . (Cheeke, 2000; Hi dkk., 2008; Ishida dkk., 2008). Saponin dan flavonoid selain bertindak sebagai imunostimulator juga berfungsi sebagai immunosupresor yang menekan respon imun. Kedua senyawa ini bersifat amfifilik yang dapat meningkatkan level inhibitor *Cyclin Dependent Kinase* (CDK) berupa protein P27 yang berperan dalam regulasi proliferasi sel di fase G0/G1 dengan menghambat senyawa G1 Cyclin-CDK yang mengakibatkan siklus sel tidak berlanjut dan akan menghentikan proliferasi sel (Wang dkk., 2007).





## BAB V

### PENUTUP

#### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Induksi senyawa karsinogen DMBA dan Estradiol pada mencit berpengaruh pada penurunan sistem imun sel T CD4 minggu ke-10 sebesar 17,34%, minggu ke-11 10,55% dan 4,34% pada minggu ke-12 dan CD8 9,76% pada minggu ke 11, 8,50% pada minggu ke-12.
2. Induksi senyawa karsinogen DMBA dan estradiol telah menurunkan jumlah sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> pada minggu ke-10, 11, dan 12.
3. Induksi DMBA dan estradiol meningkatkan jumlah sitokin proinflamasi CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> pada minggu ke-10 sebesar 5,99% dan meningkatkan jumlah CD4<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> sebesar 3,06%. Namun juga dapat menurunkan jumlah CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> pada minggu ke-11 sebesar 1,13% dan ke-12 sebesar 2,20%.
4. Ekstrak *E. scaber* telah meningkatkan jumlah sitokin proinflamasi TNF- $\alpha$  sebesar 5,81%.
5. Ekstrak *E. scaber* meningkatkan jumlah CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> pada minggu ke-10 sebesar 15,16% dan ke-11 sebesar 12,35%.
6. Pemberian Ekstrak *E.scaber* telah mengembalikan keadaan homeostasis sistem imun tubuh pada jumlah sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> pada minggu pertama dan kedua.

#### 5.2 Saran

Saran pada penelitian selanjutnya untuk menyempurnakan penelitian yang telah dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan pengamatan preparasi ulang preparat histologi payudara mencit kanker untuk mengetahui sel lobular.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai, S. 2007. **Cellular and Molecular Immunology**. 6th ed. WB Saunders. USA.
- Aggarwal BB, Gupta SC and Kim JH. 2012. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 119(3):651–665.doi:10.1182/blood-2011-04-325225.
- Anonim. 2007. 7,12-Dimethylbenz[ $\alpha$ ] anthracene.http://www.sigmaaldrich.com. 26 April 2017.
- Baratawidjaja, K. G., Iris R. 2010. **Imunologi Dasar Edisi Ke-10**. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Bidaah, A. 2013. **Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap Anatomi Histologi Hepar Mencit Betina (*Mus musculus*) yang Diinduksi 7,12 Dimetilbenz ( $\alpha$ ) Antrasen (DMBA) secara In Vivo**. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Bommhardt U., Beyer M., Hunig T. &Reichardt H. M. 2004. Molecular and cellular mechanisms of T cell development. *Cell. Mol. Life Sci.* p 61:263–280.
- Bourgeois C., Rocha B., and Tanchot C. 2002. A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science*. 297(5589). 2060–2063.
- Brown D. M. 2010. Cytolytic CD4 cells: direct mediators in infectious disease and malignancy. *Cellular Immunology*. 262(2). 89–95.
- Cavalieri E, Chakravarti D, Guttenplan J, Hart E, Ingle J, Jankowiak R, Muti P, Rogan E, Russo J, Santen R, Sutter T. 2006. Catechol Estrogen Quinones as Initiators of Breast and Other Human Cancers: Implications for Biomarkers of Susceptibility and Cancer Prevention. *Biochim.Biophys. Acta*. Acta. 2006;1766:63-78.
- Cheeke, P.R. 2000. Actual and Potential applications of *Yucca schidigera* and *Quuillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. *J. Anim. Sci.* 77. 1-10.
- Cooper, G. M. 1992. Elements of human cancer. Jones and Bartlett Publishers.
- Cordeiro M.C and Kaliwal B.B. 2011. Antioxidant Activity of Bark Extract of *Bridelia Retusa* Spreng on DMBA Induced Mammary Carcinogenesis in Female Sprague Dwley Rats. *Journal of Pharmacognosy*. Vol. Dampa2, Issue 1, 2011, pp-14-20.
- Djati M.S., Habibu H., Jatiatmaja N.A., Rifai M. 2015. Tapak liman (*Elephantopus scaber* L) extract induced CD4+ and CD8+ differentiation from hematopoietic stem cell/progenitor cell proliferation of mice (*Mus musculus*). *J.Exp. Life Sci.* 5(2). 97-103.
- Dorland, W. A. N., & A. N. William, 2012. **Dorland's illustrated medical dictionary**. Saunders/Elsevier.
- Dranoff, G. 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Review*. 4: 11-22.
- Dhulipala V.C., Welshons W.V., Reddy C.S., Cell cycle proteins in normal and chemically induced abnormal secondary palate development: a review, *Hum. Exp. Toxicol.*, 2006, 25, 675-682; Lapenna S., Giordano A., Cell Cycle Kinases as Therapeutic Targets for Cancer, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2009, 8 (7), 547-566.
- Evans C., Dalglish A.G., dan Kumar D. 2006. Immune Suppression and Colorectal Cancer. *Aliment Pharmacol Ther.* 24(8):1163-1177.

- Faizah N, Djati MS. Pengaruh Ekstrak daun *Elephantopus scaber* dan *Polyscias obtusa* terhadap modulasi sel T CD8<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Mencit Balb/C. *Jurnal Biotropika*. 2014; 2(3): 184-153.
- Hahn DB, Payne WA. 2003. **Focus on Health**. New York: Mc-Graww Hill.
- Harinaldi. 2005. **Prinsip-prinsip Statistik untuk Teknik dan Sains**. Jakarta: Erlangga.
- Harti, Agnes Sri. 2012. **Imunologi Dasar dan Imunologi Klinis**. Graha Ilmu. Yogyakarta.
- Herbein G, O'Brien WA. 2000. Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and TNF receptors in viral pathogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 223(3):241–257. doi:10.1046/j.1525-1373.2000.22335.x
- Hi Z., Rifa'i M., Lee Y.H., Shiku H., Isobe K., Suzuki H. 2008. Importance of CD80/CD86-CD28 interactions in the recognition of target cells by CD8+CD122+ regulatory T cells. *Immunology*. 124: 121-128.
- Hiradeve, S., & Rangari, V.D. 2014. *Elephantopus scaber* Linn : A review on its ethnomedical, phytochemical and pharmacological profil. *Journal of Applied Biomedicine*. 12: 49-61.
- Hung CF, Cheng WF, He L, Ling M, Juang J, Lin CT, dkk. 2003. Enhancing major histocompatibility complex class I antigen presentation by targeting antigen to centrosomes. *Cancer Res*. 63(10). 2393–8.
- Ichikawa H, Nair MS, Takada Y, Sheeja DB, Kumar MA, Oommen OV, Aggarwal BB. 2006. Isodeoxyelephantopin, a novel sesquiterpene lactone, potentiates apoptosis, inhibits invasion, and abolishes osteoclastogenesis through suppression of nuclear factor-kappaB (Nf-kappaB) activation and Nf-kappaB regulated gene expression. *Clin Cancer Res*. 12(19): 5910-5918.
- Ilyas M. 2014. Pengaruh Ekstrak Etanol Tumbuhan *Cayratia trifolia* L (Domin) Terhadap Peningkatan Makrofag dan Limfosit T Helper (CD4) Pada Tikus Model Kanker. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Ishida Y., Rifa'i M., Shi Z., Isobe K., Suzuki H. 2008. Essential role of CD8+CD122+ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology*. 180: 825-832;
- Jan, T.R., Wey S.P., Kuan C.C., Liao M.H., dan Wu H.Y. 2007. Diosgenin, a Plant-Derived Sapogenin, Enchanges Regulatory T-cell Immunity. *J. Planta Med*. 73 : 421-426.
- Jerry DJ. 2007. Roles for estrogen and progesterone in breast cancer prevention. *Breast Canc Res* 9:102.
- Jerry DJ. 2007. Roles for estrogen and progesterone in breast cancer prevention. *Breast Canc Res*. 9:102.
- Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. 2002. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2(4). 251–62.
- Kakizoe, T., 2003, Chemoprevention of cancer focusing on cinical trial, national cancer center, Jpn. *J.Clin.Oncol.*, 33(9): 421-442.
- King, R.J.B. 2000. **Cancer Biology. Edisi 2**. London School of Biological Sciences, University of Surrey. Halaman 228-231, 263-264.
- Lee LL, Lee JSC, Waldman SD, Casper RF, Grynpsas MD. 2002. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Present in Cigarette Smoke Cause Bone Loss in an Ovariectomized Rat Model. 2002; 30: 917–923.

- Lee JJ. 2007. Clinical *trial design for anticancer therapies*. In: *The Cancer Handbook, 2nd Ed.* Ed(s) Alison M. Wiley: London, UK, 1330-44.
- Liang, Q.L., Z. D. Min, Y.D. Tang. 2008. A new elemanolide sesquiterpenelactone from *Elephantopus scaber*, L. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 10. 403-407.
- Mackey M. F., Gunn J. R., Ting P. P. dkk. 1997. Protective immunity induced by tumor vaccines requires interaction between CD40 and its ligand, CD154. *Cancer Research.* 57(13). 2569–2574.
- Mackey M. F., Barth R. J. Jr., and Noelle R. J. 1998. The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells. *Journal of Leukocyte Biology.* 63(4). 418–428.
- Male, D., Jonathan, B., David, B.R., dan Ivan, R. 2006. **Immunology. Seventh Edition.** Elsevier. Kanada.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature.* 454 (7203): 436-444. PMID:18650914.
- Marmi. 2010. **Aktivitas Biologi Ekstrak Tapak Liman (*Elephantopus scaber*, L) Terhadap Perkembangan Limfosit Pada Mencit Balb/C.** Tesis. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya. Malang.
- Mish F.C. 1990. **Webster Ninth New Colegiate Dictionary.** Springfield: Merriam-Webster.
- Naciff, J.M., M. Lynn J., Suzanne M. T., Gregory J. C., Jay P. T., Gary J. O., and George P. D. 2002. Gene Expression Profile Induced by 17  $\alpha$ -Ethinyl Estradiol, Bisphenol A, and Genistein in the Developing Female Reproductive System of the Rat. *Toxicological Sciences.* 68 :184–199.
- Nally, A., R.H. Geffery, S. Tim, T. Ranjeny, J.S. Raymond. 2011. CD4+ CD25+ regulatory T Cells Control CD8+ T cell effector differentiation by modulating IL-2 homeostasis. *PNAS.* 8. 7529-7534.
- Oluboyo AO, Meludu SC, Oyenekwe CC, Oluboyo, BO, Chianakwanam GU, Emegakor C. 2014. Assessment of immune stability in breast cancer subjects. *Eur Scien J.* 10(27). 1857-7431.
- Pacheco R., Contreras F., dan Prado C. 2012. **Cells Interaction.** InTech.
- Price, S. A. 2005. **Patofisiologi: Konsep Klinis proses-proses penyakit.** Jakarta: EGC.
- Purton J. F., Boyd R. L., Cole T. J. and Godfrey D. I. 2000. Intrathymic T cell development and selection proceeds normally in the absence of glucocorticoid receptor signaling. *Immunity.* p13: 179–186.
- Quezada S. A., Simpson T. R., Peggs K. S. dkk. 2010. Tumorreactive CD4+ T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *Journal of Experimental Medicine.* 207(3). 637–650.
- Rahman, M. 2016. **Aktivitas Kemopreventif Ekstrak Temu Ireng (*Curcuma aeruginosa* Roxb) Terhadap Sel Makrofag, IFN- $\gamma$  Dan TNF- $\alpha$  Tikus Putih yang Diinduksi 7,12-Dimetilbenz[A]Antrasena.** Tesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Rahimi, S., Z.T. Zadeh, M.A.K. Torshizi, R. Omidbaigi, H. Rokni. 2011. Effect of the three herbal extracts on growth performance, immune system, blood factors and intestinal selected bacterial population in broiler chickens. *J. Agri. Tech.* 13. 527-539.

- Ranasasmita, R. 2008. Aktivitas anti kanker Ekstrak Etanol Daun Aglatan elliptica Blume pada Tikus Betina yang Diinduksi 7,12-dimethyl benz (a) antrasena. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institute Pertanian Bogor.
- Ren, W., Z.Qiao, H.Wang, L.Zhu dan L. Zhang. 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal Research Review*. 23(4): 519-534.
- Roffico, Djati MS. Efektivitas Pemberian Ekstrak Daun Polyscias obtusa dan Elephantopus scaber terhadap Modulasi Sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> pada Mencit Bunting BALB/c. *Jurnal Biotropika*. 2014; 2(3): 174-180.
- Roy R.D., Hossan Md. S., Rahmatullah M. 2015. A Review of Anticancer Potential of *Elephantopus scaber* and Its Phytoconstituents. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4(10): 86-94.
- Rusmirilin, H. 2008. Aktivitas Antikanker Ekstrak Rimpang Lengkuas Lokal (*Alpinia galanga L.*) pada Alur Sel Kanker Manusia Serta Mencit Yang Ditransplantasi Dengan Sel Tumor Primer. Disertasi. Semarang: UNDIP.
- Selvi, R., 2015. Fibrocystic Change: Proliferative Changes, in Breast Diseases. *Springer India*. 151–55.
- Shi W, Li Q, Li Z. 2005. Comparison of anti-tumor affects between transmembrane and secretory tumor necrosis factor-alpha in vitro and in vivo. *Mol Ther* 11. doi:10.1016/j.ymthe.2005.06.294
- Tedder T.F., Steeber D.A., Chen A., dan Engel P. 1995. The Selectins: Vascular Adhesion Molecules. *FASEB J*. 1995; 9(10):866-73.
- Tjidarbumi D. 1986. **Tumor Ganas pada Wanita**. Jakarta: Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.
- Umi, S., Teguh T., & Budi M. 2003. **Aplikasi Flow Cytometer di Laboratorium Klinik**. Berkala Kesehatan Klinik. 9:2.
- Vendramini-Costa DB, Carvalho JE. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Curr Pharm Des*. 2012; 18 (26): 3831-52. PMID: 22632748
- Wang, J.X., W. Tang, L.P. Shi, Wan, R. Zhou, J. Ni, Y.F. Fu, Y.F. Yang, Y. Li, J.P. Zuo, 2007. Investigated of the immunosuppressive Activity of Artemetho on T-Cell activation and proliferation. *J. Pharmacol*. 150. 652-661.
- Warren BS *dkk*. 2002. Phytoestrogen and breast cancer. <http://www.envirocancer.cornell.edu>. 25 April 2007.
- Watson, M., 2008. **Assessment of Suspected Cancer**. InnovAiT: Education and Inspiration For General Practice 1(2): 94–107.
- Weigelt, B., Geyer, F.C. & Reis-Filho, J.S., 2010. Histological types of breast cancer: How special are they? *Molecular Oncology* 4(3): 192–208.
- WHO. 2010. Cancer. <http://www.who.int/>. 4 Mei 2017.
- Wirth, C, T., V. P. Badovinac, L. Zhao, M. O. Dailey & J. T. Harty. 2009. Differentiation of central memory CD8 T cells is independent of CD62L- mediated trafficking to lymph nodes. *The Journal of Immunology*. 182: 6195-6206.
- Yager JD, Davidson NE. 2006. Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *N. Engl. J. Med*. 2006;354:270-282.
- Yang Li, Pang Y., dan Moses H.L. 2010. TGF- $\beta$  and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol*. 31(6):220-227.

- Yong Ho, W., Ky, H., Yeap, S.K., Rahim, R.A., Omar, A.R., Ling Ho, C., Alitheen, N.B., 2009. Traditional practice, bioactivities and commercialization potential of *Elephantopus scaber* Linn. *Journal of Medicinal Plants Research*. 3(13): 1212-1221.
- Yo-Ping Lai, Chung-Jiuan Jeng, and Shu-Ching Chen. 2011. The Roles of CD4+ T cells in tumor immunity. *International Scholarly Research Network Immunology*. 2011. 1-6.
- Yuliani. 2015. **Kajian Senyawa Fenolik Dari Tumbuhan Asteraceae Pada Berbagai Ketinggian Habitat Sebagai Pengendali *Spodoptera litura* Fab.** Disertasi. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya. Malang.



