

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Widuri (*Calotropis gigantea* L.)

2.1.1 Morfologi Tanaman Widuri (*Calotropis gigantea* L.)

Setiap jenis tumbuh-tumbuhan memiliki morfologi berupa bentuk, ukuran dan warna yang berbeda-beda. Allah SWT telah menjelaskan dalam Qs. al-An'am (6): 99 sebagai berikut:

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرَجُ مِنْهُ حَبًّا كَثِيرًا وَمِمَّا كَسَبَ وَنَخْلٍ مِمَّنْ طَلَعَهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَبِهٍ انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ إِنَّ فِي ذَٰلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ ﴿٩٩﴾

Artinya :“Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang **menghijau**. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu **butir** yang banyak; dan dari mayang korma mengurai **tangkai-tangkai** yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman” (Q.S al-an'am : 99).

Secara eksplisit ayat tersebut tidak menyebutkan kata morfologi secara langsung, tetapi ayat tersebut cukup menjelaskan karakteristik dari aspek morfologi suatu tumbuhan. Hal tersebut dijelaskan dengan adanya kata “hijau” (**خَضِرًا**), “biji-bijian” yang banyak (**حَبًّا**) dan “tangkai-tangkai” yang menjulang (**قِنْوَانٌ**). Kata “hijau” (**خَضِرًا**), pada ayat tersebut secara morfologi menunjukkan

warna daun yang mayoritas berwarna hijau (Jalaluddin. Al-Mahally, 1990). Salah satu contohnya yaitu daun Widuri (*Calotropis gigantea* L.). Warna hijau yang terdapat pada daun menunjukkan adanya kandungan klorofil yang berperan dalam proses fotosintesis. Walaupun mayoritas daun berwarna hijau, tetapi secara morfologi masing-masing daun berbeda baik itu dalam bentuk, bagian-bagian daun, susunan tulang daun, warna maupun susunan daun itu sendiri (Tjitrosoepomo, 1992).

Pada kalimat (حَبًّا), bermakna “biji-bijian yang banyak”. Biji sebagai bentuk morfologi suatu tanaman juga memiliki perbedaan yang menjadi ciri khas suatu tanaman. Perbedaan tersebut dapat diketahui dengan adanya perbedaan warna, bentuk biji serta susunan biji tersebut (Jalaluddin. Al-Mahally, 1990). Pada umumnya biji terdiri dari kulit biji (*spermodermis*), tali pusar (*funiculus*) dan isi biji (*nucleus seminis*) (Tjitrosoepomo, 1992).

Selain kedua kata pada ayat tersebut, karakteristik morfologi juga ditunjukkan pada kata (قُنُؤَانٌ) yang memiliki arti tangkai-tangkai. Kata tersebut dalam kitab tafsir *Jalalain* diartikan sebagai tunas-tunas buah yang tumbuh dari pucuknya (Jalaluddin. Al-Mahally, 1990). Tunas-tunas buah yang dimaksud dalam ayat tersebut yaitu bunga sebagai alat reproduksi tumbuhan. Bunga merupakan salah satu bentuk luar dari suatu tumbuhan yang terdiri dari mahkota, kelopak, putih dan benang sari. Morfologi tumbuhan yang beranekaragam tidak hanya menjadi pembeda antar setiap tumbuhan, tetapi juga menentukan fungsi masing-masing dalam kehidupan tumbuhan tersebut serta untuk mengetahui dari

mana asal bentuk dan susunannya. Morfologi yang berbeda pada setiap tumbuhan menjadi ciri khas tanaman (Tjitrosoepomo, 1992).

Ciri morfologi tanaman Widuri (*Calotropis gigantea L.*) menurut Agra (2008), adalah sebagai berikut: Akar tanaman Widuri (*Calotropis gigantea L.*) berjenis akar tunggang, yang memiliki fungsi untuk memperteguh berdirinya tanaman. Batang berbentuk bulat, kulit tebal, berwarna putih. Permukaan batang halus dengan tinggi ± 2 m, percabangan simpodial (batang utama tidak tampak jelas). Tanaman Widuri (*Calotropis gigantea L.*) memiliki daun tunggal, berbentuk bulat telur atau bulat panjang, bertangkai pendek, tumbuh berhadapan (*folia oposita*), pangkal berbentuk jantung, tepi rata, pertulangan menyirip (*pinnate*), panjang 8-30 cm dan lebar 4-15 cm berwarna hijau muda. Permukaan atas daun muda berambut rapat dan berwarna putih (lambat laun menghilang), sedangkan permukaan bawahnya tetap berambut tebal dan berwarna putih, morfologi tanaman Widuri (*Calotropis gigantea L.*) disajikan pada gambar 2.1.

Bunga majemuk, tumbuh dalam anak payung di ujung atau di ketiak daun, tangkai bunga panjang dan berambut rapat. Kelopak berwarna hijau, mahkota berwarna putih sedikit keunguan, panjang mahkota ± 4 mm. Corona berdaging padat dan seukuran atau lebih lebar dibanding tabung stamen (Ahmed *et al.*, 2005). Bunga akan berkembang menjadi buah tipe bumbung berbentuk bulat telur atau bulat panjang. Buah bumbung (*folliculus*), bulat telur, warna hijau, bentuk dengan biji lonjong, kecil dan berwarna coklat, dan memiliki ukuran 9-10 cm. Bijinya kecil, lonjong, pipih, berwarna coklat, berambut pendek dan tebal, Jika salah satu bagian tumbuhan dilukai, akan mengeluarkan getah berwarna putih,

encer, rasanya pahit dan kelat, tetapi lama-kelamaan teras manis, baunya sangat menyengat serta beracun.



Gambar 2.1 Widuri (*Calotropis gigantea L.*) (Hasil dokumentasi pribadi).

2.1.2 Taksonomi Tanaman Widuri (*Calotropis gigantea L.*)

Menurut Tjitrosoepomo (2000), taksonomi tanaman Widuri (*Calotropis gigantea L.*) adalah sebagai berikut:

Kingdom; Plantae

Sub kingdom; Tracheobionta

Super Divisi; Spermatophyta

Divisi; Magnoliophyta

Kelas; Magnoliopsida

Sub Kelas; Asteridae

Ordo; Gentianales

Famili; Asclepiadaceae

Genus; *Calotropis*

Spesies; *Calotropis gigantea L.*

2.1.3 Habitat Tanaman Widuri (*Calotropis gigantea L.*)

Widuri (*Calotropis gigantea L.*) dapat tumbuh dari biji di lahan yang relatif kering seperti padang rumput kering, lereng-lereng gunung yang rendah, dan pantai berpasir. Tanaman perenial ini mempunyai persebaran di wilayah tropis dan subtropis, di benua Asia dan Afrika (Ahmed *et al.*, 2005). Tanaman ini

cukup adaptif di lingkungan yang ekstrim kering dan panas. Di India terwakili oleh 2 spesies, yaitu *Calotropis gigantea* L. dan *Calotropis procera* L. Di beberapa negara, seperti India, Sri Lanka, Singapore, Malaysia, Filipina, Cina Selatan dan Thailand umumnya digunakan sebagai obat tradisional.

Tanaman Widuri memiliki nama latin *Calotropis gigantea* L. dan di Indonesia sendiri banyak sebutan untuk tanaman ini, seperti di daerah Sumatera masyarakat menyebutnya dengan nama rubik, biduri, lembega, rembega, rumbigo. Masyarakat Jawa menyebutnya babakoan, badori, biduri, Widuri, saduri, sidoguri, bidhuri, burigha. Masyarakat Bali menyebutnya dengan manori, maduri. Nusa tenggara menyebutnya muduri, rembiga, kore, krokoh, kolonsusu, modo kapauk, modo kampauk. Sedangkan Sulawesi menyebutnya dengan rambega (Pusat Data dan Informasi, 2013).

2.1.4 Kandungan dan Manfaat Tanaman Widuri (*Calotropis gigantea* L.)

Tumbuhan merupakan salah satu makhluk hidup ciptaan Allah SWT yang memiliki banyak sekali manfaat. Di dalam tumbuh-tumbuhan terkandung beberapa zat yang bermanfaat untuk makhluk hidup lainnya. Allah SWT menjelaskan dalam Qs. an Nahl (16): 10-11.

هُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً لَكُمْ مِنْهُ شَرَابٌ وَمِنْهُ شَجْرٌ فِيهِ تُسِيمُونَ ﴿١٠﴾
 يُنْبِتُ لَكُمْ بِهِ الزَّرْعَ وَالزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَابَ وَمِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ ﴿١١﴾

Artinya; “Dialah, Yang telah menurunkan air hujan dari langit untuk kamu, sebahagiannya menjadi minuman dan sebahagiannya (menyuburkan) tumbuh-tumbuhan, yang pada (tempat tumbuhnya) kamu menggembalakan ternakmu Dia menumbuhkan bagi kamu dengan air

hujan itu tanam-tanaman; zaitun, korma, anggur dan segala macam buah-buahan. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar ada tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang memikirkan”(Qs. an Nahl: 10-11).

Ayat di atas menjelaskan bahwa Allah SWT telah menciptakan tumbuh-tumbuhan dan tanam-tanaman yang indah dari berbagai bentuk dan warna maupun khasiat, rasa dan baunya; ada yang manis, masam, pahit, dan pedas, dan sebagainya. Diantaranya ada yang menjadi makanan manusia dan ada pula yang dapat menjadi obat dan sebagainya. Semuanya itu tidak dapat diketahui kecuali oleh orang-orang yang berilmu, dengan adanya tumbuh-tumbuhan, maka hidup binatang dan berbagai jenis hewan lainnya, dan dengan adanya tumbuhan dan binatang itu, maka hidup manusia. Semuanya itu adalah berkat kebesaran dan kekuasaan Allah SWT (Syihab, 2002).

Berdasarkan ayat di atas, Allah SWT menciptakan berbagai jenis tumbuh-tumbuhan dan berbagai manfaat di dalamnya. Salah satu contohnya adalah tanaman Widuri (*Calotropis gigantea L.*). Khasiat tanaman Widuri (*Calotropis gigantea L.*) antara lain: kulit akar Widuri (*Calotropis gigantea L.*) berkhasiat sebagai peluruh keringat (diaforetik), perangsang muntah (emetik), memacu kerja enzim pencernaan (alternatif), dan peluruh kencing (diuretik). Kulit kayu Widuri (*Calotropis gigantea L.*) berkhasiat sebagai obat muntah (emetik), bunga sebagai tonik dan penambah nafsu makan (stomakik). Daun berkhasiat *rubifasien* dan menghilangkan gatal. Getahnya beracun dan dapat menyebabkan muntah. (Dalimartha, 2003). Secara tradisional Widuri (*Calotropis gigantea L.*) telah digunakan sebagai tanaman obat untuk beberapa penyakit seperti paralisis,

pembengkakan, demam, gigitan ular beracun, penyakit vatha, cacingan dan bisul (Kumar, 2011).

Hampir semua organ tubuh tanaman mengandung senyawa-senyawa kimia bermanfaat. Secara umum, akar mengandung saponin, sapogenin, kalotropin, kalotoksin, uskarin, kalaktin, gigantin, dan harsa. Organ daun mengandung bahan aktif seperti saponin, flavonoid, polifenol, tanin, dan kalsium oksalat. Kandungan pada batang berupa tanin, saponin, dan kalsium oksalat. Getah yang dihasilkan juga memuat senyawa racun jantung yang menyerupai digitalis (Habib dan Karim 2011).

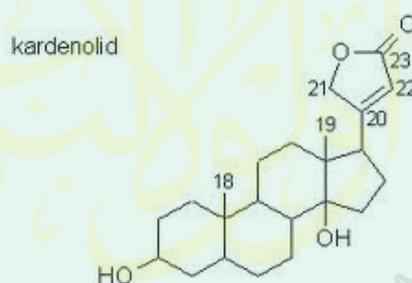
Tanaman Widuri (*Calotropis gigantea L.*) mengandung lebih dari 23 jenis senyawa bioaktif dari berbagai bagian tanaman, salah satu senyawa bioaktif tersebut adalah cardenolide yang banyak ditemukan pada bagian daun Widuri (Kumar, 2011). Cardenolide telah terbukti secara *in vitro* bersifat sitotoksik (Seeka, 2010). Komponen Senyawa Bioaktif dalam Berbagai Bagian Tanaman Widuri (*Calotropis gigantea L.*) disajikan pada table 2.1

Tabel 2.1 Komponen Senyawa Bioaktif dalam Berbagai Bagian Tanaman Widuri (*Calotropis gigantea L.*)

Chemical constituent	Plant part	Chemical nature
19-Nor-and 18,20- Epoxy-cardenolides	Leaves	Cardenolides
15 β - hydroxycardenolides	Leaves	Cardenolides
16 α - hydroxycalactinic acid methyl ester	Leaves	Cardenolides
Isohamnetin- 3- o- rutinoside	Arial parts	Flavanol
Isohamnetin- 3- o- Glucopyranoside	Arial parts	Flavanol
Taraxasteryl- acetate	Arial parts	Flavanol
Calotropain- FI	Latex	Proteinases
Calotropain- FII	Latex	Proteinases
3'- methylbutanoates of α -amyrin	Latex	Triterpene ester
Ψ - taraxasterol	Latex	Triterpene ester
Calotropins DI	Latex	Proteinases
Calotropins DII	Latex	Proteinases
Di-(2-ethylhexyl) Phthalate	Flowers	Triterpenoids

Anhydrosophoradiol-3-acetate	Flowers	Triterpenoids
Calotropone	Roots	Cardiac glycoside
Calotropises juiterenol	Roots	Terpene
Calotropises terterpenol	Roots	Terpene
Calotropbenzofuranone	Roots	Aromatic product
Coroglaucigenin	Roots	Cardenolides
Frugoside	Roots	Cardenolides
Stigmasterol	Root bark	Sterols
β - sitosterol	Root bark	Sterols
Giganticine	Root bark	Nonprotein amino acid

Cardenolide atau yang dikenal dengan kardenolida merupakan senyawa steroid yang mengandung atom C-23 dengan cincin lakton segi lima tidak jenuh yang menempel pada atom C nomor 17 bentuk beta (Smithz, 2009). Berikut (gambar 2.2) struktur dasar cardenolide :



Gambar 2.2 Struktur Dasar Cardenolide (Smithz, 2009).

Dua jenis Cardenolide baru serta 12 senyawa yang dikenal diisolasi dari ekstrak diklorometana daun *Calotropis gigantean* L. Beberapa isolat di evaluasi untuk diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap jalur sel kanker KB, BC, dan NCI-H187. Berdasarkan semua cardenolides yang diuji ditemukan memiliki efek penghambatan yang kuat. *Deoxy sugar* di rantai C-3, sebuah golongan formil di rantai C- 0, dan α , β γ -lakton tak jenuh sangat penting untuk aktivitas sitotoksik (Lhinhatrakool, 2006). Sifat cardenolide yang sitotoksik sangat berguna dalam

menyerang sel kanker. Walaupun sifatnya sitotoksik, namun cardenolide tidak menyerang sel normal karena cardenolide bertindak dalam cara yang sangat spesifik terhadap sel kanker (Seeka, 2010).

Cardenolide bertindak dalam cara yang sangat spesifik, karena cardenolide adalah inhibitor spesifik terhadap enzim ATPase. Mekanisme inhibisi tersebut dapat memacu terjadinya aktivasi jalur apoptosis serta mengaktifkan protein p53 (*tumor suppressor genes*). Protein p53 selain sebagai pengatur atau pelindung siklus sel, secara patologis juga berperan dalam proses apoptosis melalui aktivasi protein Bax yang akan merangsang mitokondria untuk memproduksi sitokrom-C. Adanya sitokrom-C bersama dengan *Apoptosis Protease Activating Factor-1* (Apaf-1) menyebabkan aktivasi *Caspase inisiator* (Caspase 9). Caspase 9 ini bekerjasama dengan Caspase 8 untuk menstimulir terbentuknya *Caspase executor* (Caspase 3) dan Caspase 3 mengaktifasi DNAase yang selanjutnya akan memecah DNA menjadi fragmen dan terjadi peningkatan apoptosis (Lhinhatrakool, 2006).

Bahan kimia khas yang terkandung yaitu *calotropin* dan *giganticine*. Hasil review yang dikemukakan oleh Ahmed *et al.*, (2005), investigasi-investigasi telah menemukan senyawa dari kelompok *cardenolide* dari akar dan daun. Pada ekstrak alkohol dari akar dan daun menghasilkan efek antikanker pada epidermal carcinoma manusia serta kultur jaringan nasofaring. Hasil uji coba tertentu, campuran senyawa tersebut bersifat sitotoksik pada beberapa tipe bentuk sel pada manusia dan mencit. Lhinhatrakool dan Sutthivaiyakit (2006), mengemukakan

bahwa adanya kelompok senyawa *cardenolides* yang terkandung memberikan efek sitotoksik pada siklus sel kanker.

Penelitian ini menggunakan sediaan dalam bentuk ekstrak etanol 70% akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.). Etanol merupakan pelarut golongan alkohol yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam karena dapat melarutkan seluruh senyawa metabolit sekunder. Selain itu etanol dipertimbangkan sebagai pelarut karena etanol lebih selektif, tidak mudah ditumbuhi kapang dan jamur, tidak beracun, netral dan absorpsinya baik. Etanol dapat bercampur dengan segala perbandingan dan panas yang diperlukan untuk perekatan yang lebih sedikit (Hargono, 1986).

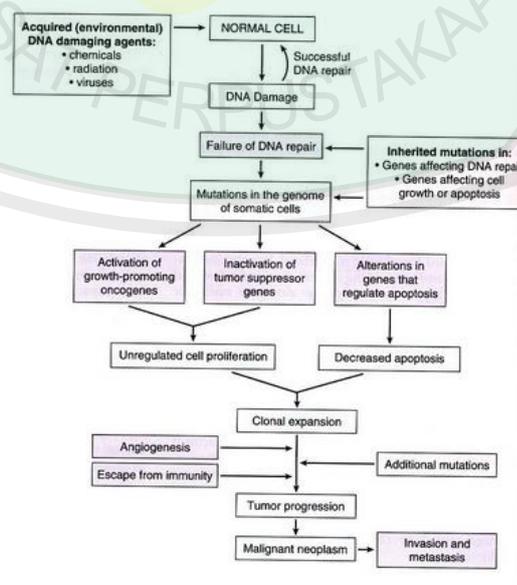
Selain pelarut, hal penting yang lain yang harus diperhatikan dalam proses ekstraksi yaitu metode yang dilakukan dalam mengekstrak. Penelitian ini metode ekstrak yang digunakan adalah metode maserasi karena metode tersebut merupakan salah satu metode umum dalam proses ekstraksi bahan alam, selain itu metode tersebut merupakan metode yang sederhana dan mudah (Hargono, 1986). Selain itu pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam terhadap pelarut tersebut (Darwis, 2000).

2.2 Karsinogenesis

Kanker merupakan suatu kelompok penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan sel yang tidak terkontrol, melakukan invasif dan menyebar dari tempat asal sel tersebut ke tempat lain dsalam tubuh. Terdapat tiga proses yang mempengaruhi jumlah sel secara keseluruhan pada makhluk hidup. Proliferasi sel

adalah faktor yang utama. Faktor kedua adalah eliminasi sel melalui kematian sel yang terprogram. Hal terakhir adalah fase inaktif selama proses diferensiasi untuk memberi kesempatan bagi sel melakukan perbaikan bagi penyimpangan yang mungkin terjadi. Mutasi pada DNA dapat mempengaruhi proses pertumbuhan, apoptosis maupun diferensiasi dan mempengaruhi jumlah sel secara keseluruhan. Sel kanker pada umumnya memiliki gangguan pada gen pengatur siklus sel yang mempengaruhi proliferasi sel yang tidak terkontrol tersebut (Susilowati, 2010).

Karsinogenesis merupakan proses pembentukan sel kanker yang patogenesisnya secara molekuler merupakan penyakit genetik. Proses ini terjadi akibat pengaruh berbagai faktor (*multifaktorial*) yang menyerang tubuh secara bertahap (*multistage*) baik pada tingkat fenotip maupun genotip. Perubahan sel normal menjadi sel kanker melalui 3 tahap inisiasi, promosi dan progresi (Susilowati, 2010). Mekanisme terjadinya karsinogenesis disajikan pada gambar 2.3.



Gambar 2.3 Skema karsinogenesis (Sarwono, 2006)

Pada tahapan inisiasi, gen tertentu mengalami kerusakan yang bersifat menetap (*irreversible*). Sebelum mengalami perubahan menjadi sel kanker, sel yang mengalami inisiasi tidak berbeda dengan sel normal, kecuali menjadi lebih sensitif terhadap perubahan dan mudah terangsang oleh faktor pertumbuhan maupun faktor penghambat. Sesudah tahapan inisiasi, terjadi tahapan berikutnya, yaitu tahap promosi. Pada tahapan ini sel yang terinisiasi akan dipacu untuk membelah oleh substansi yang dapat berupa karsinogen atau oleh bahan atau substansi promotif (*promoting agent*). Substansi ini diperkirakan mempengaruhi diferensiasi sel sehingga tidak terjadi differensiasi sesuai dengan fungsinya, yang biasanya terjadi pada sel normal setelah sel membelah. Perubahan genetik lebih lanjut diperlukan agar sel tumor dapat bermetastasis (Susilowati, 2010).

Kerusakan materi genetik pada karsinogenesis dapat terjadi pada tingkat kromosom, yaitu kelainan struktur dan jumlah kromosom atau pada tingkat gen yaitu kelainan struktur atau fungsi (misalnya metilasi, aktivitas telomerase). Kerusakan materi kromosom dapat berupa delesi (*deletion*) yaitu hilangnya satu segmen kromosom atau gen dari *coding* dan *non-coding region* atau berupa translokasi, yaitu sebagian dari suatu kromosom lepas dan menempel pada kromosom lainnya. Kelainan atau kerusakan ini umumnya didapat (*acquired*) dan terjadi pada sel somatik, tetapi ada juga yang diturunkan dan menjadi predisposisi terjadinya kanker. Gangguan dapat juga terjadi secara primer yaitu di awal perkembangan tumor atau sekunder, yaitu terjadi belakangan dan mempengaruhi perangsang tumor (Daniswastuti, 2010).

Pada tingkat molekuler, transformasi sel normal menjadi sel karsinoma tersebut disebabkan perubahan salah satu atau keseluruhan dari tiga gen pengatur yang dijumpai pada semua sel, yaitu *proto-onkogen* yang menghasilkan protein pertumbuhan, *gen supresor* yang menghasilkan protein yang menghambat pertumbuhan sel dan gen apoptosis yang menghasilkan bahan yang memprogram kematian sel (Daniswastuti, 2010).

Selain ketiga gen tersebut, terdapat pula gen yang ikut mempengaruhi proses karsinogenesis, yaitu gen yang berperan dalam proses DNA repair. Gen ini mempengaruhi profesi atau daya tahan sel dengan mempengaruhi kemampuan organisme tersebut untuk memperbaiki kerusakan *non-lethal* yang terjadi pada gen lain, termasuk *proto-onkogen*, *gen supresor* dan *gen apoptosis*. Kerusakan pada gen ini dapat menyebabkan timbulnya mutasi pada genom dan kemudian menimbulkan transformasi neoplasma. Gen DNA repair ini harus mengalami inaktivasi pada kedua alelnya untuk menyebabkan ketidakstabilan genom, sehingga gen DNA repair ini seringkali dikelompokkan sebagai gen supresor (Daniswastuti, 2010).

Proto-onkogen adalah gen yang terdapat pada sel normal, berfungsi untuk mengatur proliferasi normal. Yang termasuk *proto-onkogen* adalah gen yang memproduksi (1) faktor pertumbuhan; (2) Reseptor faktor pertumbuhan; (3) *Kinase non reseptor*; (4) *Transduser sinyal*; (5) Faktor transkripsi dan (6) Protein nukleus. Proto-onkogen dapat berubah sifat menjadi onkogenik akibat transduksi virus (*viral oncogenes; v-oncs*) atau akibat pengaruh yang mengubah perilaku *in situ*, sehingga menjadi *cellular oncogenes (c-oncs)*. Perubahan yang dialami

proto-onkogen menjadi onkogen selalu bersifat mengaktivasi, artinya mereka menstimuli suatu fungsi sel yang mengakibatkan pertumbuhan dan differensiasi sel. Onkogen menghasilkan protein yang disebut onkoprotein, yang menyerupai produk normal dari *proto-onkogen*. Yang membedakannya dari protein normal adalah ketiadaan unsur yang penting untuk pengendalian, serta produksinya oleh sel yang mengalami transformasi tidak dipengaruhi oleh faktor pertumbuhan atau sinyal eksternal lainnya. Pada kondisi yang normal, proliferasi sel melalui tahapan-tahapan. (1) Terikatnya faktor pertumbuhan pada reseptor spesifik membran sel, (2) Aktivasi reseptor faktor pertumbuhan yang bersifat sementara dan terbatas, yang kemudian akan mengaktivasi beberapa protein transduksi sinyal pada bagian dalam membran plasma, (3) Transmisi sinyal transduksi melintasi sitosol menuju inti melalui *second messenger*, (4) Induksi dan aktivasi faktor pengendali pada inti yang menginisiasi transkripsi DNA, (5) Sel kemudian memasuki siklus sel, menghasilkan pembelahan sel (Daniswastuti, 2010).

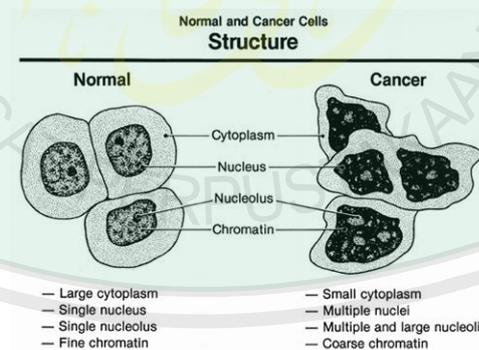
Onkogen dan onkoprotein merupakan bentuk penyimpangan dari tahapan dan produk yang terlibat dalam proses proliferasi sel tersebut, mengakibatkan pertumbuhan dan differensiasi sel yang mengarah kepada neoplasma. Aktivasi onkogen merangsang produksi reseptor faktor pertumbuhan yang tidak sempurna, yang memberi isyarat pertumbuhan terus-menerus meskipun tidak ada rangsang dari luar. Proses proliferasi yang tidak terkendali tanpa diiringi maturasi sel dapat mengakibatkan gangguan differensiasi sel. Pada tahap selanjutnya, gangguan differensiasi sel akan mencerminkan progresivitas sel menjadi ganas (Susilowati, 2010).

Gen supresor faktor yang menghambat pertumbuhan sel dalam siklus sel. Sehingga bila teraktivasi akan menghentikan pertumbuhan sel dan terjadi keseimbangan yang harmonis. Setiap gen supresor menjadi protein transduksi sinyal yang membawa pesan menghambat pertumbuhan (*growth inhibition*) dari bagian sel yang satu ke bagian sel yang lain melalui suatu *signaling cascade* dan disampaikan kepada *responder protein*. Bila salah satu protein supresor hilang atau tidak berfungsi, maka salah satu mata rantai sinyal hilang sehingga pesan yang dibawanya tidak sampai ke tujuan. Produksi gen supresor dapat mendeteksi adanya sinyal pertumbuhan abnormal atau keadaan abnormal dalam siklus sel, misalnya adanya kerusakan DNA atau produk replikasi DNA yang salah. Pada keadaan ini gen supresor bekerja sebagai regulator negatif bagi berlangsungnya proliferasi dan siklus sel. Telah banyak gen supresor yang teridentifikasi, namun di antara semuanya, p53, PTEN, dan pRb sejauh ini masih memegang peranan terpenting. Gen Rb yang menghasilkan protein pRb mengendalikan sel sebelum memasuki fase S (sintesis DNA). Ia tidak secara langsung menghambat transkripsi, tetapi berinteraksi dengan faktor transkripsi E2F dan ko-represor lainnya sehingga transkripsi dapat dihambat. Selain itu pRb juga menginduksi apoptosis dengan melibatkan E2F dan gen supresor lainnya, yaitu p53. Gen supresor p53 berperan dalam menghambat siklus sel, differensiasi, apoptosis, senescence dan angiogenesis. Fungsi *gen supresor phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome ten* (PTEN) yang normal adalah mencegah jalur proliferasi AKT/P13K menjadi berlebih. Pada banyak keganasan ditemukan PTEN mengalami kerusakan.

2.3 Kanker

Kanker atau karsinoma adalah pembentukan jaringan baru yang abnormal dan bersifat ganas (*maligne*). Satu kelompok sel dengan meandadak menjadi liar dan memperbanyak diri secara pesat dan terus menerus (*proliferasi*). Sel-sel kanker ini menginfiltrasi jaringan sekitarnya dan memusnahkannya (Aryudani, 2011). Berdasarkan lokalisasinya kanker atau yang merupakan tumor ganas dibedakan sebagai berikut: karsinoma (pada jaringan kelenjar), sarcoma (pada jaringan penghubung), limfoma (pada ganglia limfatik) dan leukemia (pada sel darah) (Siswandono, 2000).

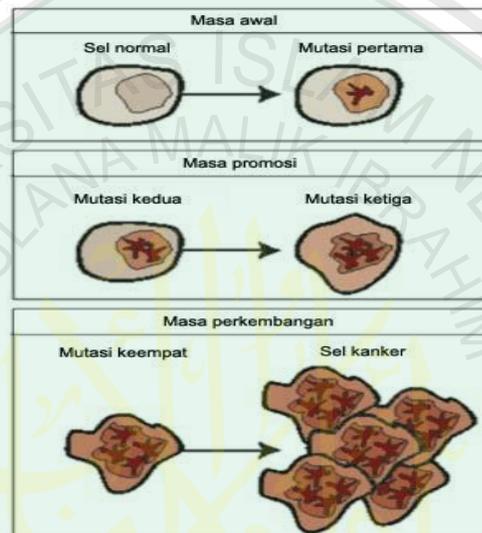
Kanker juga merupakan salah satu penyakit degeneratif yang membutuhkan perhatian khusus, karena sebagian besar penderita kanker berakhir dengan kematian (Rusmarilin, 2008). Perbedaan struktur sel normal dan sel kanker (Cancerhelps, 2010) disajikan pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Perbedaan struktur sel normal dengan sel kanker (Cancerhelps, 2010)

Sel kanker merupakan sel yang pertumbuhannya berlebih dan tidak dikoordinasi oleh jaringan normal (Spector dan Spector, 1993). Hal ini berbeda dengan sel normal. Sel normal diatur oleh mekanisme kontrol kuat yang mendorong sel-sel tersebut membelah dengan tepat ketika diperlukan. Mekanisme kontrol tersebut juga mencegah sel-sel tersebut tumbuh dan membelah secara

tidak tepat. Sel pada jaringan manusia dewasa terlindung secara normal pada proses pembelahan. Sel-sel tersebut bereproduksi hanya untuk menggantikan sel-sel lain yang telah mati atau rusak. Sel kanker telah kehilangan beberapa kontrol sehingga akan membelah secara terus menerus (Solomon *et al.*, 2005). Proses perubahan sel normal menjadi sel kanker disajikan pada Gambar 2.5.



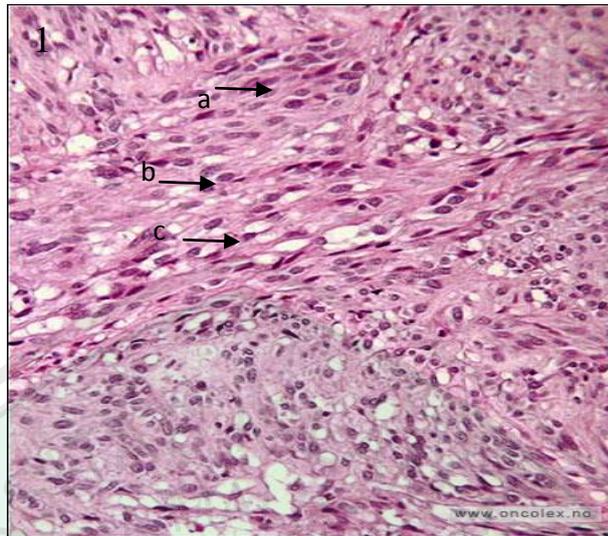
Gambar 2.5 Proses perubahan sel normal menjadi sel kanker (Medicastore, 2006)

2.3.1 Fibrosarcoma

Fibrosarcoma adalah neoplasma ganas yang berasal dari sel mesenkim, dimana secara histologi sel yang dominan adalah sel fibroblas yang membelah secara berlebihan dan tidak terkendali, dapat menyerang jaringan setempat dan dapat menuju lokasi lain dalam tubuh (bermetastase). Derivatif sel mesenkim, fibroblas, ditemukan di seluruh tubuh dan sel-sel ini bertanggung jawab untuk memproduksi kolagen. Fibroblas juga mensintesis *glykoaminoglican*, *glikoprotein* dan serat *reticular* serta elastis. Pembelahan sel yang tidak terkontrol dapat menginvasi jaringan lokal serta dapat bermetastase jauh ke bagian tubuh lain (Krygjer and Velerae, 2009).

Fibrosarcoma dapat dikenali sebagai massa berinfiltrasi besar, lunak, putih, kelabu mutiara. Pada transeksi, tumor tampak sebagai daging ikan segar yang khas. Area nekrosis atau perdarahan sering terdapat pada tumor ini, yang mencerminkan kecepatan tumbuh diluar kemampuan perbekalan darah. Secara histologi, lesi menunjukkan berbagai derajat anaplasia. Beberapa fibrosarcoma berdiferensiasi baik ditandai oleh fibroblas yang tampak matur dengan beberapa mitosis dan beberapa pleomorfi ringan sel-selnya (Robbins dan Kumar, 1995).

Gambaran secara makroskopis fibrosarcoma mempunyai ciri-ciri fenotip dengan pertumbuhan yang berlebih, invasi lokal dan mempunyai kemampuan penyebaran yang jauh. Sifat-sifat tersebut ditemukan pada tahap-tahap penampilan suatu fenomena yang disebut progresif kanker. Secara mikroskopis fibrosarcoma mempunyai ciri-ciri: susunan sel yang tidak teratur, selularitas yang padat, terdapat banyak sel dan ukuran sel yang berbeda (*pleomorphism*), inti sel membesar, kromatin menebal, kasar, tidak rata, terjadi hiperkromasi dan basofilik. Anak inti tajam dan sering menonjol dengan ukuran yang bervariasi serta terjadi banyak mitosis. Bentuk inti bermacam-macam dan kromosomnya aneuploid. (Cotran *et al.*, 1999). Ciri-ciri mikroskopis fibrosarcoma disajikan pada gambar 2.6.



Gambar 2.6 Histologi fibrosarcoma pada Subkutan (Onkolex, 2014).
a; pleomorfism, b. susunan se tidak teratur, c: bentuk basofilik

2.3.2 Epidemiologi Fibrosarcoma

Penyebab pasti dari fibrosarcoma belum diketahui, namun ada beberapa faktor yang sering berkontribusi seperti faktor radiasi yang menyebabkan adanya perubahan genetik oleh karena hilangnya alel, poin mutasi, dan translokasi kromosom. Selain beberapa penyebab di atas, fraktur tulang, penyakit paget, dan operasi patah tulang juga dapat menimbulkan fibrosarcoma sekunder (Ortho Bullets, 2014).

Fibrosarcoma lebih jarang ditemukan dibandingkan tumor-tumor tulang lainnya. Tipe ini umumnya terjadi pada orang-orang yang berumur 35-55 tahun dengan proporsi jumlah laki-laki yang lebih dominan terkena daripada perempuan. Fibrosarcoma juga mempengaruhi jaringan-jaringan lunak dari kaki di belakang lutut (Maharani, 2009). Seseorang dengan riwayat infark tulang atau iradiasi merupakan faktor risiko pada fibrosarcoma sekunder. Fibrosarcoma pada grade yang tinggi merupakan faktor risiko yang signifikan untuk terjadi metastasis dan kekambuhan lokal (Cance *et al.*, 2010).

2.3.3 Patofisiologi Fibrosarcoma

Fibrosarcoma dapat terjadi akibat pengaruh paparan radiasi dari lingkungan yang mengakibatkan terjadinya translokasi kromosom pada sekitar 90% kasus. *x-radiation* dan *gamma radiation* paling berpotensi menyebabkan kerusakan jaringan. Ionisasi radiasi menyebabkan terjadinya perubahan genetik yang meliputi mutasi gen, mutasi *mini-satellit* (perubahan jumlah *DNA sequences*), formasi mikronukleus (tanda kehilangan atau kerusakan kromosom), aberasi kromosomal (struktur dan jumlahnya), perubahan ploidi (jumlah dan susunan kromosom), *DNA strand breaks* dan instabilitas kromosom. Ionisasi radiasi mempengaruhi semua fase dalam siklus sel, namun fase G₂ merupakan yang paling sensitif (Ortho Bullets, 2014).

Sepanjang hidup sel pada sumsum tulang, mukosa usus, epitelium testikular seminiferus, folikel ovarium rentan mengalami trauma dan sebagai akibatnya akan selalu mengalami proses mitosis. Iradiasi selama proses mitosis mengakibatkan aberasi kromosomal. Tingkat kerusakan bergantung pada intensitas, durasi, dan kumulatif dari radiasi. DNA dapat mengalami kerusakan secara langsung maupun tidak langsung melalui interaksi dengan *reactive products* yang berupa radikal bebas. Pengamatan terhadap kerusakan DNA diduga sebagai hasil perbaikan DNA atau sebagai akibat dari replikasi yang salah. Perubahan ekspresi gen memicu timbulnya suatu tumor. Sebagai akibat paparan *x-radiation* dan *gamma radiation* sangat kuat berkorelasi terhadap timbulnya keganasan atau kanker. Kerusakan DNA yang dimanifestasikan dalam bentuk translokasi kromosom gene COL1A1 pada kromosom 17 dan gen *platelet-derived*

growth factor B pada kromosom 22 mengakibatkan terjadinya keganasan pada jaringan fibrous. Perubahan fibrosarcoma dicirikan dengan pertumbuhan pola *herringbone* yang nampak pada klasik fibrosarcoma (Wong, 2008).

2.3.4 Gejala Fibrosarcoma

Gejala pada fibrosarcoma pada awal mulanya sering tidak tampak atau tanpa dirasakan adanya nyeri. Biasanya tumor baru tampak setelah timbul gejala dan teraba suatu benjolan. Pada lesi yang besar terjadi peregangan pada kulit dan nampak mengkilat berwarna keunguan. Pada massa yang sangat besar terjadi pelebaran pembuluh darah vena (Sriwibowo, 2005).

Pada gambaran histologi fibrosarcoma memiliki pola pertumbuhan fascicula sel berbentuk fusiform ataupun spindle. Batas antar sel nampak tidak jelas dengan sedikit sitoplasma dan serabut kolagen membentuk anyaman paralel. Histologi grading terutama berdasarkan derajat selularitas, diferensiasi sel, gambaran mitotik dan jumlah kolagen yang dihasilkan oleh sel nekrosisnya (Wong, 2008).

2.3.5 Deteksi Fibrosarcoma

Deteksi adanya fibrosarcoma dapat dilakukan melalui 2 pemeriksaan, yaitu pemeriksaan fisik dan pemeriksaan penunjang.

1. Pemeriksaan fisik

Pada pemeriksaan fisik yang perlu dicari adalah (Sriwibowo, 2005): (a). Lokasi tumor. (b). Deskripsi tumor, yang meliputi tegas atau tidaknya batas tumor, ukuran tumor, permukaan tumor, konsistensi tumor, nyeri

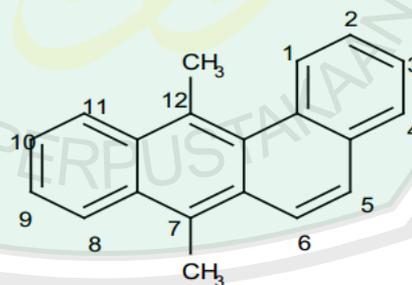
atau tidak saat di tekan. (c). Kelejar getah bening regional apakah teraba atau tidak.

2. Pemeriksaan Penunjang (Spector, 1993):
 - (a). Foto Rontgen: pada foto rontgen biasanya tampak massa isodens berlatar belakang bayangan otot. Selain itu juga bisa menunjukkan reaksi tulang akibat invasi tumor jaringan lunak seperti destruksi, reaksi periosteal atau remodeling tulang.
 - (b). Ultrasonografi: ada pemeriksaan tumor jaringan lunak, ultrasonografi memiliki dua peran utama yaitu dapat membedakan tumor kistik atau padat dan mengukur besarnya tumor. (1). CT-scan: Pada kasus fibrosarcoma pemeriksaan CT-scan biasanya digunakan untuk mendeteksi klasifikasi dan osifikasi serta melihat metastase tumor di tempat lain. (2). MRI: merupakan modalitas diagnostik terbaik untuk mendeteksi, karakterisasi, dan menentukan stadium tumor. MRI mampu membedakan jaringan tumor dengan otot di sekitarnya dan dapat menilai bagian yang terkena pada komponen neurovaskuler. MRI juga bisa digunakan untuk mengarahkan biopsi, merencanakan teknik operasi, mengevaluasi respon kemoterapi, penentuan ulang stadium, dan evaluasi jangka panjang terjadinya kekambuhan lokal. (3). Histopatologi: Pemeriksaan histopatologi dilakukan dengan melakukan biopsi. Biopsi terbuka meliputi insisi dan eksisi. Insisi dilakukan bila ukuran tumor lebih dari 3 cm sementara pemeriksaan eksisi dilakukan jika ukuran tumor kurang dari 3 cm. Biopsi tertutup meliputi core biopsy/Tru-cut biopsy dan biopsi aspirasi jarum halus.

2.4 DMBA (7,12–dimethylbenz(α)Antracena) Bahan Pemicu Kanker

Senyawa 7,12–dimethylbenz(α)Antracena (DMBA) berbentuk padat, berwarna kuning kehijau-hijauan dan bersifat pengoksidasi. Memiliki banyak efek toksik diantaranya, efek toksik pada proses pencernaan, pernapasan, dan absorpsi kulit serta dapat menimbulkan iritasi kulit, mata, dan saluran gastrointestinal. Gejala-gejala yang ditunjukkan pada hewan percobaan diantaranya kemandulan, skin effect, efek sebacea (berminyak) dari kelenjar minyak, dan efek antioksidan pada hati (Susilowati, 2010).

DMBA merupakan salah satu dari *hidrokarbon aromatik polisiklik* (PAH) karsinogenik yang paling poten (Susilowati, 2010). Struktur kimia pada Gambar 2.7, menunjukkan senyawa tersebut memiliki 4 macam cincin aromatik yang berikatan khas struktur PAH dengan tiga atau lebih cincin aromatik dan 2 substituen metil.

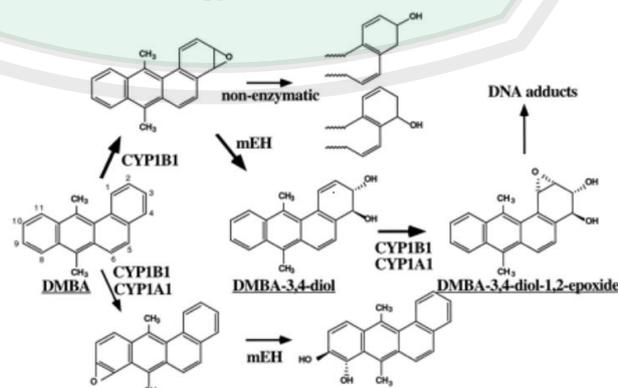


Gambar 2.7 Struktur DMBA (7,12–dimethylbenz(α) Antrasena)
(Dandekar *et al.*, 1986).

DMBA merupakan senyawa karsinogen spesifik untuk eksperimental kanker payudara dan kanker kulit pada hewan percobaan, tetapi bukan merupakan karsinogen direct. Aktivitas karsinogenik dari DMBA terjadi melalui aktivasi metabolisme (biotransformasi) untuk menghasilkan karsinogenesis (Gambar 2.7). Jalur metabolisme DMBA melalui aktivasi enzim sitokrom P450 membentuk

proximate carcinogen dan ultimate carcinogen. Proximate carcinogen adalah metabolit intermediet yang akan mengalami metabolisme lebih lanjut menjadi ultimate carcinogen. Ultimate carcinogen merupakan metabolit akhir dari karsinogen induk yang akan membentuk DNA *adduct*, suatu proses awal inisiasi kanker (Dandekar *et al.*, 1986).

Senyawa DMBA adalah prokarsinogen yang dikonversi menjadi metabolit yang paling poten (*ultimate carcinogen*) yaitu DMBA -3,4-diol-1,2 epoxide (Gambar 2.8). Cytochrome P-450 dan *microsomal epoxide hydrolase* (mEH) memetabolisme DMBA menjadi dua metabolit yaitu metabolit elektrofilik dan metabolit yang mampu membentuk DNA *adduct*. Cytochrome P-450 CYP1B1 mengoksidasi DMBA menjadi 3,4-epoxides yang diikuti dengan hidrolisis epoxides oleh mEH membentuk *metabolit proximate carcinogenic* dan DMBA-3,4-diol. Metabolit ini nantinya dioksidasi oleh CYP1A1 atau CYP1B1 menjadi metabolit ultimate carcinogenic (DMBA-3,4-diol-1,2 epoxide). Enzim CYP1A1 dan CYP1B1 ini diekspresikan baik dalam hati dan payudara dimana kedua enzim ini dapat diinduksi oleh DMBA (Susilowati, 2010).



Gambar 2.8 Jalur metabolisme DMBA (Miyata *et al.*, 1999)

Seperti yang terlihat pada Gambar 2.8, metabolit aktif dari DMBA adalah DMBA-3,4-diol-1,2 epoxides yang mampu membentuk DNA *adduct*. Metabolit DMBA yang membentuk DNA *adduct* menentukan mutasi dalam gen dan mampu mengendalikan siklus sel, sehingga mendorong pembelahan sel kanker. Senyawa epoxide tersebut nantinya akan berikatan secara kovalen dengan gugus amino eksosiklik *deoksiadenosin* (dA) atau *deoksiguanosin* (dG) pada DNA. Interaksi ini (DNA *adduct*) dapat menginduksi mutasi pada gen-gen penting sehingga menyebabkan iniasi kanker (Miyata *et al.*, 1999). Kemampuan metabolit DMBA yang merupakan ultimate carcinogen berikatan dengan DNA salah satunya menyebabkan mutasi somatik dari onkogen Harvey Ras-1 pada kodon 61 kanker payudara dan kanker kulit (Dandekar *et al.*, 1986).

2.5 Sistem Imun

Sistem imun adalah semua mekanisme yang digunakan untuk mempertahankan keutuhan tubuh sebagai perlindungan terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan oleh berbagai bahan dalam lingkungan. Pertahanan tersebut terdiri atas sistem imun spesifik (*adaptive/acquired*) dan non-spesifik (*natural/innate*). Respon imun spesifik tergantung pada adanya pemaparan benda asing, pengenalan, kemudian reaksi terhadapnya. Sebaliknya, respon imun non-spesifik terjadi sesudah pemaparan insial dan pemaparan lanjutan terhadap benda asing. Kemudian terjadi diferensiasi selektif *self* dan *non-self* di mana respon non-spesifik ini tidak tergantung pada pengenalan spesifik (Baratawidjaja, 2013).

Sistem pertahanan non-spesifik dibagi atas 4 komponen yaitu: yang pertama adalah pertahanan fisik atau mekanik (mekanik termasuk kulit, selaput

lendir, silia saluran nafas, batuk atau bersin, akan mencegah masuknya berbagai kuman patogen ke dalam tubuh). kedua adalah pertahanan biokimiawi, ke tiga pertahanan humoral (bahan dalam sirkulasi berperan pada pertahanan humoral adalah komplemen, *C reactive protein* (CRP) dan Interferon). dan yang terakhir adalah pertahanan seluler (Komponen sistem imun yang berperan dalam sistem imun non-spesifik seluler adalah fagosit, makrofag, dan sel NK). Berbeda dengan sistem imun non-spesifik, sistem imun spesifik mempunyai kemampuan untuk mengenal benda yang dianggap asing bagi dirinya. Benda asing yang pertama kali muncul dalam tubuh segera dikenali oleh sistem imun spesifik sehingga terjadi sensitisasi sel-sel sistem imun tersebut. Jika sel sistem imun tersebut terpapar kembali dengan benda asing yang sama. Benda asing yang terakhir ini akan dikenal lebih cepat, kemudian dihancurkan olehnya. Karena sistem tersebut hanya dapat menghancurkan benda asing yang sudah dikenal sebelumnya, sistem imun itu disebut spesifik (Baratawidjaja, 2013).

Sistem imun tubuh dapat diatur, salah satunya dengan menggunakan imunomodulator. Ada 2 cara mekanisme kerja dari obat imunomodulator, yaitu *up regulation* (menguatkan sistem imun tubuh atau imunostimulasi dan imunorestorasi), dan *down regulation* (menekan reaksi sistem imun yang berlebihan atau imunosupresi) (Kresno, 2010).

Respon imun menjalankan tiga fungsi yaitu pertahanan (*defense*), homeostasis dan pengawasan (*surveillance*). Fungsi pertahanan bertujuan untuk melawan invasi mikroorganisme dan senyawa asing lainnya. Fungsi homeostatis untuk menjaga keseimbangan isi tubuh secara normal, meliputi degenerasi dan

fungsi katabolik normal seperti pemusnahan sel-sel yang tidak berguna atau rusak. Sedangkan fungsi pengawasan bertujuan untuk memonitor jenis-jenis sel yang abnormal atau sel mutan (Bellanti, 1993). Menuespon imun adalah suatu reaksi tubuh terhadap benda asing yang mencakup interaksi seluler yang dapat dilihat dengan adanya zat-zat yang disekresikan oleh sel.

2.5.1 Respon Imun Terhadap Kanker

Pada beberapa penelitian menggunakan hewan percobaan menunjukkan bahwa mekanisme efektor baik innate/alamiah/non-spesifik maupun adaptif/didapat/spesifik dapat membunuh tumor secara *in vitro*. Berikut ini adalah komponen yang berperan dalam mekanisme efektor dalam melawan tumor (Kresno, 2010).

2.5.1.1 Respon Imun Innate atau non-spesifik

Sel-sel efektor yang berperan adalah sel NK (*Natural Killer*) dan makrofag.

A. Sel Natural Killer (sel NK)

Peran sel NK pada imunitas tumor *in vivo* belum jelas, antara lain membunuh sel tumor secara langsung dan sel-sel yang terinfeksi virus. Diduga mencit dengan defisiensi sel T tidak mengandung tumor spontan karena mereka mempunyai sejumlah sel NK normal yang berperan dalam *immune surveillance*. Dilaporkan juga pasien dengan defisiensi sel NK mempunyai insiden lebih tinggi menderita limfoma yang dihubungkan dengan infeksi EBV (Budiana, 2013).

Kemampuan sel NK membunuh sel tumor ditingkatkan oleh sitokin termasuk IFN, TNF, IL-2, dan IL-12. Karena itu peran sel NK dalam aktivitas anti

tumor bergantung pada sel T dan makrofag yang memproduksi sitokin tersebut. Ketiga jenis IFN (α , β , dan γ) dapat meningkatkan fungsi sel NK. IFN mengubah pre-NK menjadi sel NK yang mampu mengenal dan melisiskan sel sasaran dan mempermudah interaksi dengan sel sasaran. Sel NK mungkin berperan dalam *immune surveillance* terhadap tumor yang sedang tumbuh, khususnya tumor yang mengekspresikan antigen virus. Aktivitas sel NK sering dihubungkan dengan prognosis. Beberapa penelitian mengungkapkan bahwa ada korelasi antara penurunan kemampuan sitotoksitas sel NK dengan peningkatan risiko metastasis. Berdasarkan penelitian-penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa sitotoksitas alami dapat berperan dalam mencegah pertumbuhan kanker dan metastasis (Budiana, 2013).

B. Makrofag

Makrofag merupakan mediator seluler yang potensial dalam imunitas anti tumor. Beberapa bukti yang mendukung hipotesis itu adalah: (1) makrofag dapat berakumulasi dalam jumlah besar dalam jaringan tumor; (2) makrofag mempunyai kemampuan alami atau bisa diaktifkan untuk melisiskan sel sasaran; (3) penekanan fungsi makrofag dengan berbagai cara misalnya dengan memberikan silica dihubungkan dengan peningkatan insiden tumor dan metastasis; (4) transfer adaptif makrofag yang diaktifkan *in vitro* maupun *in vivo* menghambat penyebaran tumor; (5) stimulasi makrofag dengan berbagai imunomodulator dihubungkan dengan berkurangnya pertumbuhan tumor atau insiden tumor (Budiana, 2013).

Secara *in vitro* makrofag dapat melisis lebih banyak sel-sel tumor dibandingkan dengan sel-sel normal. Mekanismenya melalui pengenalan langsung antigen tumor yang terletak dipermukaan sel dan aktivasi makrofag oleh IFN- γ yang diproduksi oleh sel T spesifik tumor. Makrofag dapat melisis sel-sel tumor melalui beberapa mekanisme seperti mekanisme makrofag membunuh organisme infeksius antara lain dengan enzim lisosomal melalui *reactive oxygen* dan *nitric oxide*. Makrofag aktif juga memproduksi TNF yang hanya membunuh tumor tetapi tidak membunuh sel-sel tumor. TNF membunuh sel-sel tumor melalui efek toksik langsung yang dimediasi oleh pengikatan TNF ke reseptor sel-sel tumor dan mengaktifkan jalur sinyal yang mengakibatkan terjadinya apoptosis, sedangkan efek tidak langsung kerja TNF adalah melalui sistem peredaran tumor yaitu menyebabkan nekrosis tumor dengan jalan menginduksi trombosis pembuluh darah (tumor mengeluarkan faktor yang bekerja pada endotel dan mengakibatkan terjadinya trombosis).

2.5.1.2 Respon Imun Adaptif atau Spesifik

Sel-sel tumor dapat menginduksi respon imun adaptif/didapat/spesifik, baik respon imun humoral maupun seluler yang muncul secara spontan terhadapnya. Pada beberapa contoh respon imun terhadap tumor, sel T bersifat protektif (Budiana, 2013).

A. Limfosit T

Limfosit CD8⁺ atau CTL merupakan sel yang memegang peranan dalam imunitas tumor yaitu dengan cara membunuh sel-sel tumor. Sel T dapat berperan sebagai protektif terhadap tumor. Kemampuan CTL dalam imunitas anti tumor

terbukti dalam percobaan binatang yang diinduksi dengan karsinogen atau pada tumor yang terinduksi oleh virus. CTL bertugas mengenali dan membunuh sel-sel tumor yang mengekspresikan peptida yang berasal dari protein sel-sel normal yang mengalami mutasi atau protein virus onkogen yang dipresentasikan dengan bantuan molekul MHC kelas I (Modjtahedi, 2007).

Selain CTL, sel mononuklear yang berasal dari tumor solid yang disebut TIL (*tumor-infiltrating lymphocyte*) juga termasuk CTL. Respon $CD8^+$ terhadap antigen tumor memerlukan APC, misalnya sel dendritik. Sel-sel tumor umumnya tidak berasal dari APC sehingga tidak mengekspresikan ko-stimulator yang diperlukan untuk menginisiasi respon sel T atau molekul MHC kelas II yang diperlukan untuk menstimulasi sel T helper dan memulai diferensiasi sel $CD8^+$. Ada kemungkinan bahwa antigen sel tumor ditelan oleh APC dan kemudian diproses dalam APC, sedangkan peptida yang berasal dari antigen tetap ada dan berikatan dengan molekul MHC kelas I agar dikenal oleh $CD8^+$. APC mengekspresikan ko-stimulator yang memberikan sinyal yang diperlukan untuk diferensiasi $CD8^+$ menjadi CTL anti tumor, dan APC mengekspresikan molekul MHC kelas II yang berasal dari antigen tumor dan mengaktifkan $CD4^+$. Proses ini dikenal sebagai cross-presentation atau cross-priming (Gewies, 2003).

2.5.2 Interferon

Interferon adalah sitokin antivirus dari jenis glikoprotein yang disintesis oleh sel sebagai respon dari infeksi virus, pengertakan sistem imun atau dari berbagai stimulator kimiawi lainnya. Protein ini dapat menghambat replikasi virus dengan mengganggu (*interfere*) sintesis protein dan RNA virus. Hal tersebut

memungkinkan untuk komunikasi antara sel-sel untuk memicu pertahanan pelindung dari sistem kekebalan tubuh yang membasmi penyakit patogen atau tumor (Tizard, 2004).

Interferon merupakan antiviral antibiotik dengan spectrum luas, bersifat spesies spesifik dimana IFNs manusia bekerja pada manusia dan tidak pada kebanyakan spesies vertebrata. IFNs tikus bekerja pada tikus. Merupakan pengecualian IFNs manusia mempunyai aktivitas pada kelinci dan tikus (Klein, 1982).

Tiga tipe utama dari interferon yaitu interferon alfa (IFN- α), interferon beta (IFN- β), dan interferon gamma (IFN- γ) (Tizard, 2004).

1. Interferon alfa (IFN- α), merupakan grup dari setidaknya 16 molekul yang berbeda yang diproduksi dari leukosit yang terinfeksi virus;
2. Interferon beta (IFN- β), protein tunggal yang diproduksi dari fibroblast yang terinfeksi virus;
3. Interferon gamma (IFN- γ), lymphokine yang diproduksi dari sel T dan sel NK (*natural killer cells*) setelah terekspos IL-2. Sel T juga dapat memproduksi IFN- α jika terinfeksi virus.

Berat molekul dari interferon pada umumnya ada di kisaran 16,000–25,000 daltons. IFN- γ terdapat dalam dua bentuk, dengan berat molekul 20,000 dan 25,000 daltons. IFN- α dan IFN- β stabil pada pH 2, sedangkan IFN- γ bersifat labil pada pH rendah. Semua tipe interferon tahan terhadap panas terdapat pada tipe interferon dibawah ini (Tizard, 2004).

Tabel 2.2 Tipe Interferon

Tipe	Jumlah protein	Sumber	Berat Molekul (Dalton)	Kesetabilan pada pH 2	Penginduksi
IFN- α	ϕ 16	Leukosit	16,000-25,000	Stabil	Virus Polinukleotida
IFN- β	1	Fibroblas	20,000	Stabil	Virus polinukleotida
IFN- γ	1	Limfosit	20,000-25,000	Labil	Mitogen Antigen

Interferon memiliki peran penting dalam memerangi infeksi virus RNA. Interferon disekresikan ketika sejumlah besar dsRNA (secara abnormal) ditemukan di dalam sel. Peran dsRNA sendiri adalah sebagai pemicu produksi interferon melalui *Toll Like Receptor 3* (TLR 3). Gen yang mengkodekan sitokin ini diaktifkan dalam sel yang terinfeksi, kemudian interferon disintesa dan disekresikan kepada sel-sel yang terdapat disekitarnya (Tizard, 2004).

Ketika sel mati karena virus RNA dan kemudian mengalami lisis, ribuan virus ini akan menginfeksi sel-sel terdekat. Sel-sel yang sebelumnya telah menerima interferon akan memperingatkan sel-sel yang lain akan adanya “bahaya” virus. Kemudian sel-sel tersebut akan mulai memproduksi sejumlah besar protein yang dikenal dengan *protein kinase R* (PKR). PKR secara tidak langsung diaktivasi oleh dsRNA (sebenarnya oleh 2'-5' *oligoadenilat*, yang diproduksi oleh 2'-5' *oligoadenilatsintetase* yang diaktivasi oleh TLR3) dan kemudian memulai transfer gugus fosfat (*fosforilasi*) ke suatu protein yang

dikenal sebagai eIF2 (*Eukaryotic Initiation Factor 2*) atau Faktor Inisiasi Translasi Eukariotik). Setelah fosforilasi, eIF2 memiliki kemampuan untuk menginisiasi translasi (memproduksi protein-protein yang dikodekan oleh seluler mRNA). Kemampuan ini dapat mencegah replikasi virus, menghambat fungsi ribosom sel normal, dan membunuh baik virus maupun sel inang jika responnya menjadi aktif untuk waktu yang cukup. Semua RNA di dalam sel juga akan terdegradasi, mencegah mRNA ditranslasikan oleh eIF2, jika beberapa eIF2 gagal untuk difosforilasi (Gilman, 2001).

Interferon dapat menyebabkan meningkatnya aktivitas penginduksi p53 dalam sel-sel yang terinfeksi virus, dan meningkatkan produksi dari produk gen p53. Hal ini akan menyebabkan terjadinya apoptosis, dan membatasi kemampuan virus untuk menyebar. Meningkatnya level transkripsi tidak terlihat dalam sel-sel yang tidak terinfeksi, tetapi hanya sel-sel yang terinfeksi yang menunjukkan peningkatan apoptosis. Transkripsi yang meningkat ini mungkin berperan untuk mempersiapkan sel-sel yang sesuai sehingga dapat merespon dengan cepat ketika terjadi infeksi. Ketika p53 diinduksis berhubungan dengan kehadiran virus, ia berlaku tidak seperti biasanya. Beberapa target gen p53 diekspresikan ketika virus menginfeksi, tetapi lainnya tidak, terutama untuk yang berespon terhadap kerusakan DNA. Salah satu gen yang tidak diaktivasi adalah p21, yang dapat mempertahankan hidup sel. Dengan membiarkan gen ini inaktif, maka akan membantu efek apoptotik. Dengan kata lain, interferon meningkatkan efek apoptotik dari p53, meskipun tidak mutlak diperlukan. Sel-sel normal mengeluarkan respons apoptotik yang lebih kuat dari sel-sel tanpa p53. Selain itu

interferon juga memiliki efek immunomodulator. Di mana interferon dapat memperbaiki sistem kekebalan tubuh, baik sistem kekebalan alamiah maupun yang didapat dengan beberapa cara, yakni (Nurhayati, 2001):

1. Meningkatkan fagositosis makrofag dan daya sitotoksik sel NK (*Natural Killer*).
2. Meningkatkan ekspresi *Human Leukocyte Antigen* (HLA) pada permukaan sel yang terinfeksi oleh virus. HLA tersebut bersama antigen virus pada permukaan sel akan dikenali oleh limfosit T sitotoksik yang kemudian akan menyebabkan lisis sel.
3. Turut berperan dalam *lymphokine cascade* dan produksi IL-1, IL-2
4. Menginduksi produksi *Prostaglandin* (PGE₂) oleh hipotalamus dan menimbulkan demam.

IFN- α merupakan pemacu yang sistem imun adaptif dan bawaan (*innate*) yang kuat. IFN- α diproduksi dalam jumlah besar oleh sel *dendritik plasmacytic* dan mengaktifkan sel NK dan menggertak perbedaan monosit menjadi sel dendritik dan juga kematangan dan aktivitas sel dendritik. IFN- α juga berperan serta dalam peralihan dari sistem imun non spesifik ke sistem imun spesifik dan mendorong respon sel dari sel T γ/δ dan menggertak memori proliferasi sel T, mengaktifkan sel T naive, dan meningkatkan produksi antibodi (Tizard, 2004).

Interferon dapat meningkatkan sekaligus menghambat fungsi sel. Fungsi penghambat utamanya adalah memperlambat pertumbuhan sel normal dan sel neoplastic. IFN- γ meningkatkan kemampuan makrofag untuk membunuh bakteri dan protozoa dengan cara aktivasi makrofag. Aktivasi ini penting untuk

perkembangan resistensi terhadap mikroorganisme patogen tertentu. Sebagai contoh, bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, *Rhodococcus equi*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Brucella abortus*, *Listeria monocytogenes* dan *Salmonellae*, dan juga protozoa parasit *Toxoplasma gondii*, yang secara normal dapat hidup dan tumbuh di dalam makrofag (Moreland, 2004).

Antibodi tidak dapat memberikan perlindungan terhadap bakteri tersebut di atas karena pertumbuhannya yang intraseluler. Tetapi, saat proses infeksi, sel respon imun digertak dan sel T menghasilkan IFN- γ . Interferon ini menyebabkan ukuran makrofag membesar dan aktivitas metabolik serta mobilitasnya meningkat. Jumlah reseptor Fc bertambah sehingga fagositosis meningkat. Lisosom di dalam makrofag ini membesar dan mengandung enzim hidrolitik dalam jumlah besar, sementara juga mensekresikan IL-1 dalam jumlah yang banyak dan akhirnya terjadilah penghancuran organisme intraseluler (Tizard, 2004).

IFN- γ juga meningkatkan dan efek suppressor sel B, tergantung waktu treatment. Jika diberikan di akhir respon imun, interferon meningkatkan produksi antibodi jika diberikan sebelum pemberian antigen, interferon bersifat supresif. Interferon juga memiliki efek kompleks pada sel respon imun sehingga dapat menekan reaksi campuran limfosit tetapi juga meningkatkan *graft rejection*. IFN- γ meningkatkan atau menekan reaksi hipersensitivitas, tergantung pada dosis dan waktunya (Nurhayati, 2001).

Interferon meningkatkan aktivitas sel T sitotoksik dengan menginduksi sel T untuk memproduksi reseptor IL-2 dan IL-2. Selain itu, interferon juga

meningkatkan aktivitas sel suppressor dengan menggejutkan sintesis prostaglandin, ACTH, dan endorfin. Jadi interferon dapat bersifat immunosupresif dan juga dapat meningkatkan resistensi sel inang terhadap serangan tumor dan virus (Tizard, 2004).

IFN- γ disebut juga interferon tipe-tipe, yaitu glikoprotein homodimer yang terdiri dari dua subunit 21 kD sampai 24 kD. Variasi subunit ini disebabkan bervariasinya derajat glikosilasi, tetapi masing-masing subunit identik dengan polipeptida 18 kD yang dikode dari gen yang sama. Diproduksi oleh aktivasi sel T CD4⁺, sel T, CD8⁺ dan sel NK 47, 48. IFN- γ berfungsi dalam imunoiregulasi sebagai berikut (Tizard, 2004):

- a) IFN- γ adalah aktivator yang kuat untuk fagosit mononuklear.

Dapat secara langsung menginduksi sintesis enzim yang memediasi "*respiratory burst*" sehingga memungkinkan makrofag manusia membunuh mikroba yang telah difagositosis. Makrofag dapat bekerjasama dengan TNF untuk menginduksi NO Sintase sehingga menghasilkan NO yang berfungsi untuk melakukan fagositosis intrasel. Merupakan *Macrophage Activating Factors* (MAFs) utama yang menunjukkan adanya bukti bahwa makrofag diaktivasi oleh sel T helper 1. Sedangkan MAFs yang lain adalah GM-CSF, dan yang pengaruhnya kecil yaitu: IL-1, TNF dan LT.

- b) IFN- γ dapat meningkatkan ekspresi baik MHC-I maupun MHC-II

Jadi IFN- γ akan melipatgandakan fase kognitif respon imun dengan memacu ikatan MHC-II dengan Limfosit T CD4⁺. Dengan pelipatgandaan

fase kognitif ini, secara *in vivo*, IFN- γ akan mempercepat respon seluler maupun humoral.

- c) IFN- γ akan meningkatkan sel T untuk berdiferensiasi.

IFN- γ akan memacu sel T CD 4⁺ untuk berdiferensiasi ke subset sel Th 1 dan menghambat proliferasi Th2. Pada percobaan dengan mencit. Efek ini mungkin terjadi karena diperan tarai oleh aktivasi sel fagosit mononuklear yang melepaskan IL-12 dan sel T yang mengekspresikan reseptor IL-12. IFN - γ juga dibutuhkan untuk maturasi sel T sitolitik CD8⁺.

- d) IFN- γ berfungsi pada sel B untuk memacu beralih ke sub kelas IgG2a dan IgG3 di mencit dan menghambat beralih ke IgG1 dan IgE.

IFN- γ akan mempengaruhi sub tipe IgG dalam berikatan dengan Fc γ Rs pada sel fagosit dan NK, juga berpengaruh secara kuat pada IgG yang diaktivasi oleh komplemen. Jadi IFN- γ akan menginduksi respon antibodi yang akhirnya berpengaruh pada eliminasi mikroba oleh fagosit.

- e) IFN- γ mengaktivasi netrofil untuk melakukan respiratory burst meskipun pengaruhnya kalah kuat dibandingkan TNF.

- f) IFN- γ memacu aktivitas sitolitik dari sel-sel NK yang sangat berperan pada imunologi tumor.

- g) IFN- γ merupakan aktivator sel-sel endothel vaskuler, membantu adhesi sel T CD4⁺ dan perubahan morfologiknya untuk melakukan ekstravasasi.

IFN- γ juga meningkatkan fungsi TNF di sel-sel endothelial.

Hasil akhir dari berbagai aktivitas ini adalah memacu reaksi inflamasi yang mendatangkan makrofag dan disisi lain menghambat reaksi eosinofil yang

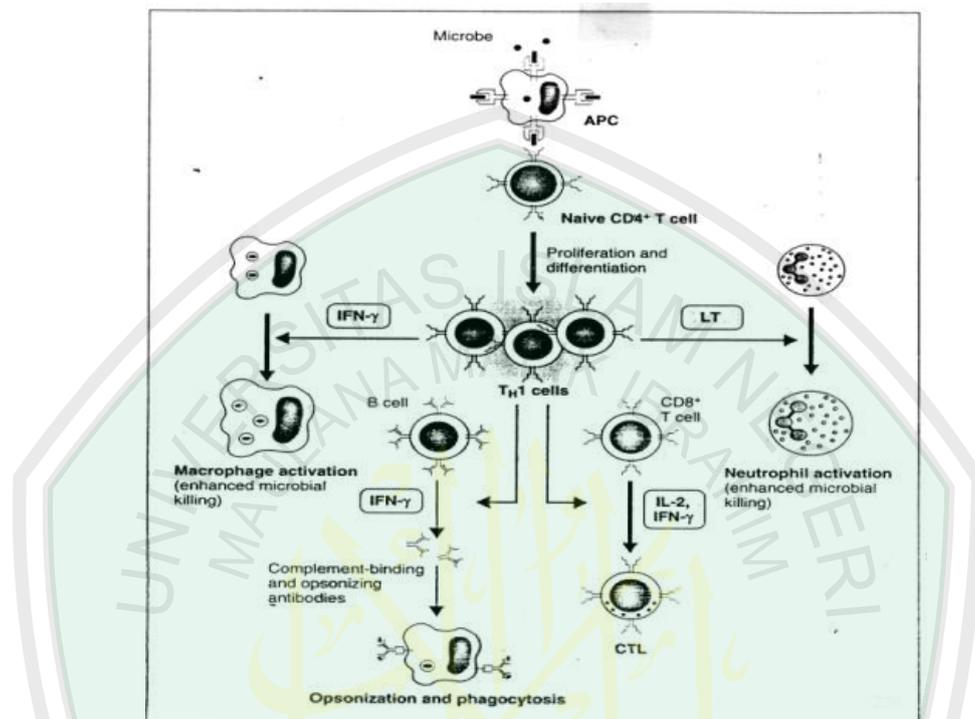
tergantung Ig E. Mencit knock out yang telah dirusak IFN- γ atau dirusak reseptor IFN- γ menunjukkan efek imunologis yang berat. Efek imunologis tersebut adalah meningkatnya suseptibilitas terhadap infeksi mikroba intraseluler, penurunan produksi NO makrofag, penurunan ekspresi molekul MHC-II pada makrofag setelah diinfeksi dengan mycobacteria, penurunan kadar serum antibodi IgG2a dan Ig G3 dan defek fungsi sel NK (Kanter, 2004).

2.5.3 Peran IFN- γ Terhadap Kanker

Sel makrofag yang telah teraktifasi akan berdiferensiasi tergantung tipe stimulan terutama adalah sitokin yang dihasilkan pada saat pengenalan antigen. Sitokin terpenting yang dihasilkan sel Th1 pada fase efektor adalah IFN- γ , peran IFN- γ disajikan dalam (Gambar 2.9). IFN- γ akan memacu aktifitas pembunuhan kanker, sel-sel fagosit dengan meningkatkan destruksi intrasel pada sel kanker yang difagositosis. Jadi fungsi pokok efektor Th1 adalah sebagai pertahanan infeksi dimana proses fagositosis sangat diperlukan. Th1 juga mengeluarkan IL-2 yang berfungsi sebagai faktor pertumbuhan autokrin dan memacu proliferasi dan diferensiasi sel T CD8⁺. Jadi Th1 berfungsi sebagai pembantu (*T-helper*) untuk pertumbuhan sel limfosit T sitotoksik yang juga meningkatkan imunitas terhadap mikroba intrasel. Sel-sel Th1 memproduksi LT yang meningkatkan pengambilan dan aktifasi netrofil (Nurhayati, 2001)

Limfosit t, limfosit T-helper dan T-sitotoksik sama-sama berperan dalam mengeliminasi sel kanker. Sel kanker yang mengandung antigen kanker akan mengekspresikan antigennya bersama molekul MHC kelas 1 yang kemudian membentuk kompleks melalui TCR (*T-cell Reseptor*) dari sel T-sitotoksik (Sel T

CD8⁺), mengaktivasi sel T-sitotoksik untuk menghancurkan sel kanker tersebut (Nurhayati, 2001)



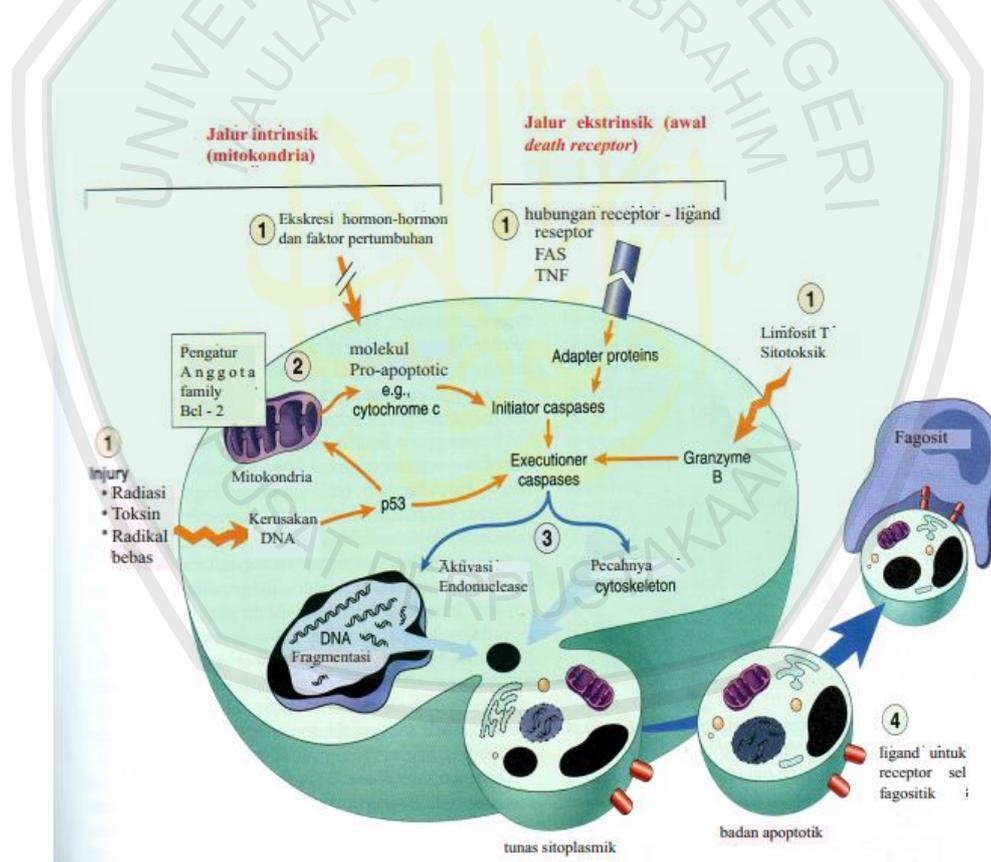
Gambar 2.9. Peran IFN- γ Pada Proses Penghambatan Kanker (Nurhayati, 2001)

2.6 Apoptosis Sel

Apoptosis merupakan kematian sel yang terprogram pada beberapa proses fisiologi penting yaitu, penghancuran dari sel terprogram selama *embryogenesis*, berbagai stimulus dari *injury* yang ringan, delesi dari *autoreactive* sel T pada *thymus*, dan involusi fisiologis yang tergantung pada hormon. Apoptosis harus dibedakan dengan nekrosis karena apoptosis merupakan proses bunuh diri untuk menghancurkan sel yang rusak (Kumar, 2005). Apoptosis merupakan mekanisme *homeostatis* sel untuk memelihara populasi sel dalam jaringan tubuh dan dalam mekanisme pertahanan tubuh. Ada 2 jalur apoptosis yaitu jalur ekstrinsik dan jalur

intrinsik. Jalur ekstrinsik melibatkan Fas, sedangkan jalur intrinsik melibatkan sitokrom C yang dirilis dari mitokondria (Kumar, 2005).

Mitokondria memegang peran kunci dalam proses regulasi kematian sel. Hal ini karena adanya sitokrom C yang berada di *space* membran mitokondria. Dalam keadaan normal Sitokrom C tidak boleh keluar dari mitokondria. Perannya penting pada fosforilasi oksidatif dari reaksi berantai dalam produksi ATP. Proses apoptosis digambarkan di dalam gambar 2.10 dimana terdapat dua jalur yaitu ekstrinsik dan intrinsik.



Gambar 2.10. Proses Apoptosis (Kumar, 2005)

a) Jalur ekstrinsik

Jalur ekstrinsik melibatkan *Fas Ligan* (FASL) yang dimiliki oleh sel Tc. Sel Tc ini terkenal untuk *recovery*, sel Tc akan berkeliling dan bisa

mengenali reseptor FAS. Ketika ada target sel yang akan dibunuh (karena rusak), maka sel tadi mengekspresikan reseptor FAS. Hal inilah yang membuat dia bisa dikenali oleh FAS *ligan* (Kumar, 2005).

Ketika mereka saling menempel, terjadi perubahan bentuk pada *domain cytosolic (death domain)* dari reseptor FAS. Reseptor FAS sendiri adalah protein integral yang memiliki domain ekstraseluler dan *domain cytosolic*. Perubahan domain dari death domain ini akan dikenali oleh protein *adaptor* yaitu FADD. Kompleks FADD tersebut dapat mendegradasi proCaspase 8 menjadi Caspase 8 (aktif). Caspase 8 selanjutnya bisa mendegradasi proCaspase 3 menjadi Caspase 3 (aktif). Caspase 3 memiliki banyak peran, salah satunya memotong banyak substrat lain (Yau, 2004).

b) Jalur intrinsik

Pada mitokondria di membrannya terdapat protein Bcl-2 atau Bcl-XL yang berikatan dengan Bax. Kompleks protein tersebut menjaga sitokrom C supaya tidak keluar dari mitokondria. Jika ada protein Bad datang, maka akan mengganggu kompleks tadi dengan berikatan pada Bcl-2 atau Bcl-XL sehingga Bax terpisah. Bax kemudian berkolaborasi dengan Bax lain membentuk *channel formation* (suatu kanal). Kanal ini menjadi tempat masuknya Ca^{2+} . Ketika ion ini masuk maka keluarlah sitokrom C.

Sitokrom C yang berada di sitosol membentuk kompleks dengan Apaf-1, ATP, dan Caspase 9 dinamakan *Apoptosom* (suatu *holoenzime*, gabungan beberapa protein). Kompleks ini adalah suatu protease yang bertugas memotong atau mendegradasi protein lain. Salah satunya adalah proCaspase 3

menjadi Caspase 3. Caspase 3 yang jumlahnya berlimpah ini akan memotong sitoskeleton (kerangka sel), PARP, ICAD (Yau, 2004).

Apoptosis-inducing factor (AIF) dan CAD *endonuklease* juga dilepaskan dari intermembran mitokondria, pindah ke nukleus dan mendegradasi kromatin sehingga membentuk DNA *ladder*. CAD semula terikat ICAD dan kompleks ini tidak aktif. Namun jika kehadiran Caspase 3, maka ICAD lepas dan CAD bisa masuk inti dan terjadi proses pemotongan DNA. Sel yang sudah terpotong-potong ini dinamakan *apoptotic bodies*, yang selanjutnya akan dikenali oleh *makrofag* untuk di fagositosis (Yau, 2004).

2.6.1 Caspase 3

Caspase adalah kelompok dari *cysteine-aspartic acid protease*. Caspase disintesis sebagai rantai tunggal *zymogen* tidak aktif dengan N-terminal prodormain ditambah subunit besar dan kecil katalisis (Merrgans, 2000). Aktivasi dari *zymogen* didapatkan lewat pemecahan proteolitik pada tempat yang identik dengan motif Caspase yang dikenal. Mekanisme ini memungkinkan Caspase dan memproses dirinya sendiri atau Caspase *zymogen* lain (Meergans, 2000).

Caspase dapat dibagi menjadi kelompok inisiasi dan kelompok eksekusi. Caspase 3 merupakan salah satu contoh dari Caspase kelompok eksekusi. Aktivasi Caspase 3 merupakan salah satu poin kunci dalam transmisi dari sinyal apoptosis karena aktifitas pemecahan Caspase 3 menghasilkan berbagai morfologi dan jenis biokimia dari apoptosis (Meergans, 2000).

Caspase 3 merupakan bentuk aktif dari proCaspase 3 yang diaktifkan oleh Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9, Caspase 10, CPP32 *activating protease*,

granzyme B. Ketika Caspase 3 aktif maka akan menstimulasi pelepasan dari PARP. Pelepasan dari PARP ini akan melakukan degranulasi sel dan akhirnya dikenali oleh makrofag dan difagositosis (Ting, 2005).

Pada penelitian sebelumnya HPV tidak hanya menghambat gen p53 namun menghambat aktivasi dari gen Caspase 3 (Ocampo, 2007). Ekspresi mRNA Caspase 3 yang rendah dihubungkan dengan prognosis yang buruk. Ekspresi gen Caspase 3 yang tinggi dihubungkan dengan meningkatnya sensitivitas terhadap terapi. Pada penelitian *Glioma* mengindikasikan bahwa terjadi penurunan secara spontan dari pertumbuhan sel pada kadar Caspase 3 yang tinggi. Oleh karena itu, gen ini merupakan faktor prognosis yang signifikan dalam tumor (Kobayashi, 2007).

2.6.2 Pewarnaan Imunohistokimia

Imunohistokimia merupakan suatu teknik untuk menentukan keberadaan suatu antigen atau protein target dalam jaringan atau sel dengan menggunakan reaksi antigen-antibodi. Teknik ini diawali dengan prosedur histoteknik, yaitu suatu prosedur pembuatan irisan jaringan yang kemudian diamati di bawah mikroskop. Setelah terbentuk suatu irisan jaringan, selanjutnya dapat dilakukan prosedur imunohistokimia (Fatchiyah, 2006).

Interaksi antara antigen dan antibodi merupakan suatu reaksi kimia yang tidak kasat mata, sehingga diperlukan visualisasi adanya ikatan tersebut dengan melabel antibodi yang digunakan dengan enzim atau fluorokrom. Enzim yang digunakan untuk melabel selanjutnya direaksikan dengan substrat kromogen, yaitu substrat yang menghasilkan produk akhir berwarna dan tidak larut, yang

dapat diamati dengan mikroskop cahaya. Pengecatan imunohistokimia yang menggunakan fluorokrom untuk melabel antibodi, dapat langsung diamati tanpa harus direaksikan dengan bahan-bahan yang menghasilkan warna di bawah mikroskop fluorescence (Fatchiyah, 2006). Terdapat dua metode dasar dalam melakukan identifikasi antigen pada suatu jaringan melalui pemeriksaan imunohistokimia, yaitu (CCRC, 2009):

1) Metode langsung (*direct method*)

Metode langsung merupakan metode pengecatan satu langkah, oleh karena hanya melibatkan satu jenis antibodi, yaitu antibodi yang berlabel. Salah satu contoh antibodi berlabel adalah antiserum terkonjugasi *Fluorescein isothiocyanate* (FITC) dan rodhamin.

2) Metode tidak langsung (*indirect method*)

Metode tidak langsung menggunakan dua macam antibodi, yaitu antibodi primer yang tidak berlabel dan antibodi sekunder yang berlabel. Antibodi primer berperan dalam mengenali antigen yang diidentifikasi pada jaringan (*first layer*) sedangkan antibodi sekunder akan berikatan dengan antibodi primer (*second layer*). Antibodi kedua merupakan anti-antibodi primer. Pelabelan antibodi sekunder diikuti dengan penambahan substrat berupa kromogen. Kromogen merupakan suatu gugus fungsi senyawa kimiawi yang dapat membentuk senyawa berwarna bila bereaksi dengan senyawa tertentu. Penggunaan kromogen *fluorescent dye* seperti FITC, rodhamin dan *texas-red* disebut metode *immunofluorescence*, sedangkan penggunaan kromogen enzim seperti

peroksidase, alkali fosfatase atau glukosa oksidase disebut metode immunoenzyme.

Antibodi agar dapat terjamin dapat mengikat antigen, maka sel harus difiksasi dengan ditempelkan pada bahan pendukung padat sehingga antigen menjadi immobile. Hal ini dapat dilakukan dengan menumbuhkan sel pada slide mikroskop, coverslip, atau bahan pendukung plastik yang sesuai. Secara umum, terdapat dua macam metode fiksasi, yaitu pelarut organik dan reagen cross-linking. Pelarut organik seperti alkohol dan aseton akan memindahkan lipid, mendehidrasi sel dan mengendapkan protein. Reagen cross-linking seperti paraformaldehid membentuk jembatan intermolekuler melalui gugus amino bebas (CCRC, 2009)

2.7 Mencit (*Mus musculus L.*) Sebagai Hewan Coba

Adapun taksonomi mencit adalah sebagai berikut (Lenoir *et al.*, 2005):

Kingdom; Animalia

Filum; Chordata

Kelas; Mamalia

Ordo; Rodentia

Famili; Muridae

Sub-famili; Murinae

Genus; Mus

Spesies : *Mus musculus L.*

Mencit merupakan hewan yang paling banyak digunakan sebagai hewan model laboratorium dengan kisaran penggunaan antara 40-80%. Menurut Agus (2008), mencit banyak digunakan sebagai hewan laboratorium (khususnya digunakan dalam penelitian biologi), karena memiliki keunggulan-keunggulan

seperti siklus hidup relatif pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, variasi sifat-sifatnya tinggi, mudah ditangani, serta sifat produksi dan karakteristik reproduksinya mirip hewan lain, seperti sapi, kambing, domba, dan babi. Menurut Malole dan Pramono (1989), berbagai keunggulan lain dari mencit seperti: cepat berkembang biak, mudah dipelihara dalam jumlah banyak, variasi genetiknya tinggi dan sifat anatomis dan fisiologisnya terkarakterisasi dengan baik. Menurut Setijono (1985) menyatakan bahwa secara umum dapat dipergunakan sebagai pengganti dari subjek diinginkan, sebagai model dalam penelitian biomedis, sebagai instrumen untuk mengukur suatu besaran kualitas atau kuantitas biologis (uji biologi), dan sebagai penghasil produk-produk biologi.

Berdasarkan sifat genetiknya terdapat tiga macam mencit (Malole dan Promono, 1989): 1) Random Breed Mice yaitu mencit yang dikawinkan secara acak dengan mencit yang tidak ada hubungan keturunan, 2) Inbreed mice yaitu mencit hasil perkawinan antar saudara sebanyak lebih dari 20 turunan, dan 3) F1-Hybrid yaitu mencit hasil perkawinan antara dua galur yang inbreed. Berdasarkan lingkungan hidupnya mencit dibagi dalam empat kategori: 1) mencit bebas hama yaitu mencit yang bebas dari mikroorganisme yang dapat dideteksi, 2) mencit yang hanya mengandung mikroorganisme tertentu, 3) mencit yang bebas mikroorganisme patogen tertentu, dan 4) mencit biasa yaitu mencit yang dipelihara tanpa perlakuan khusus (Agus, 2008).

Semua makhluk ciptaan Allah SWT dapat dibedakan antara satu dengan yang lain baik itu dari morfologi maupun cara berjalan. Allah berfirman dalam Q.S. an Nuur (24): 45.

وَاللَّهُ خَلَقَ كُلَّ دَابَّةٍ مِّن مَّاءٍ فَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَى بَطْنِهِ وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَى رِجْلَيْنِ وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَى أَرْبَعٍ تَخْلُقُ اللَّهُ مَا يَشَاءُ إِنَّ اللَّهَ عَلَىٰ كُلِّ شَيْءٍ قَدِيرٌ

Artinya: "Dan Allah telah menciptakan semua jenis hewan dari air, maka sebagian dari hewan itu ada yang berjalan di atas perutnya dan sebagian berjalan dengan dua kaki sedang sebagian (yang lain) berjalan dengan empat kaki. Allah menciptakan apa yang dikehendaki-Nya, sesungguhnya Allah Maha Kuasa atas segala sesuatu" (Q.S. an Nur; 45)

Sifat hewan berdasarkan cara berjalannya ada beberapa jenis, yang pertama; hewan melata yang berjalan dengan perutnya, jenis hewan kedua; hewan yang berjalan dengan 2 kaki dan yang ketiga; hewan yang berjalan dengan 4 kaki. Contoh hewan yang berjalan dengan perutnya yaitu: cacing, ular, kadal, ulat dan sebagainya; hewan yang berjalan dengan 2 kaki diantaranya yaitu burung, ayam, manusia dan sebagainya. Mencit merupakan hewan yang berjalan dengan 4 kaki, dan kaki bagian depan berfungsi sebagai tangan bila mencit tersebut makan.

Adapun data biologis mencit di laboratorium adalah sebagai berikut (Smith dan Mangkoewidjojo, 1997):

Tabel 2.3 Data Biologis Mencit (*Mus musculus L*) di Laboratorium

Lama hidup	1-2 tahun, bisa sampai 3 tahun
Lama bunting	19-21 hari
Umur disapih	21 hari
Umur dewasa	35 hari
Umur dikawinkan	8 minggu (jantan dan betina)
Berat dewasa	20-40 gr jantan; 18-35 gr betina
Berat lahir	0,5-0,1 gram
Jumlah anak	Rata – rata 6 bisa 15
Suhu (rektal)	36-39°C (rata-rata 37,9°C)
Konsumsi oksigen	2,38-4,48 ml/gr/jam
Volume darah	75-80 ml/kg
Sel darah merah	7,7-12,5x10 ³ /mm ³
Sel darah putih	6,0-12,6x10 ³ /mm ³

Trombosit	150-400x10 ³ /mm ³
Hb	13-16/100ml
Kecepatan tumbuh	1gr/hari

Kualitas makanan berpengaruh pada kondisi mencit, di antaranya mata, hidung, gerak dan rambut yang dapat mempengaruhi kemampuan mencit mencapai potensi genetik untuk tumbuh, berbiak, umur, atau reaksi terhadap pengobatan dan lain-lain. Oleh karena itu, status makanan hewan yang diberikan dalam percobaan biomedis mempunyai pengaruh nyata pada kualitas hasil percobaan. Persiapan dalam menyediakan makan mencit yang lengkap termasuk memperhatikan kira-kira 50 komponen penting. Persiapan ini meliputi membuat resep dan membuat makanan sehingga mengandung komponen-komponen dengan kadar yang diperlukan dengan mempertimbangkan faktor-faktor lain yang mempunyai pengaruh terhadap kualitas makanan termasuk apakah bahan makanan mudah dicerna, lezat dan mencit berselera untuk makan, cara menyiapkan dan menyimpan makanan serta konsentrasi zat kimia atau bahkan bahan pencemar (Agus, 2008).