

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Kanker payudara saat ini merupakan jenis kanker yang paling sering ditemukan di Indonesia setelah kanker leher rahim. WHO melaporkan bahwa pada tahun 1998 insiden kanker pada wanita sekitar umur 50 tahun adalah 2 dari 1000 wanita pertahun.. Di Indonesia berdasarkan "*Pathological Based Registration*" kanker payudara mempunyai insidens relatif 11,5%. Diperkirakan di Indonesia mempunyai insidens minimal 20.000 kasus baru pertahun; dengan kenyataan bahwa lebih dari 50% kasus masih berada dalam stadium lanjut. Data Badan Registrasi Kanker Ikatan Ahli patologi Indonesia (BRK-IAPI) tahun 1994 menunjukkan bahwa kanker payudara tetap menduduki peringkat ke-2 tertinggi setelah keganasan pada wanita kanker leher rahim dengan angka kejadian 17,1% dari keseluruhan kanker pada wanita. Penelitian di Semarang melaporkan pada tahun 2001 ditemukan kasus kanker payudara sebanyak 769 kasus, dan masih sama dengan tahun-tahun sebelumnya berada pada peringkat ke-2 tertinggi kasus keganasan pada wanita setelah kanker leher rahim. Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 2002 jumlah kasus kanker payudara yang dilaporkan oleh rumah sakit di Jawa Tengah adalah lebih tinggi dibanding kanker leher rahim, dimana jumlah kasus kanker payudara 3.593 (43,91%) dibanding kanker leher rahim sebanyak 2.780 kasus (33,98%).^{1,2,3,4}

2.1. Adenokarsinoma mamma

Karsinoma merupakan keganasan yang timbul dari sel-sel epitel. Bersifat ganas karena menginvasi jaringan dan organ sekitar serta menyebar ke organ-organ jauh. Adenokarsinoma adalah karsinoma yang timbul dari jaringan kelenjar. Kanker merupakan penyakit di mana proliferasi sel tidak terkontrol.

Klasifikasi menurut WHO ¹⁵

a. Berdasarkan gambaran histologis, klasifikasi kanker payudara sebagai berikut:

1. Kanker Payudara Non Invasif

- Karsinoma intraduktus non invasif
- Komedokarsinoma, solid, kribriiformis, papiler, dan mikrokapiler.
- Karsinoma lobular in situ

2. Kanker Payudara Invasif

- Karsinoma duktus invasif
- Karsinoma lobular invasif
- Karsinoma musinosum
- Karsinoma meduler
- Karsinoma papiler invasif
- Karsinoma tubuler
- Karsinoma adenokistik
- Karsinoma apokrin

b. Berdasarkan gejala klinik

Klasifikasi stadium ditentukan dengan sistem TNM menurut *International Union Against Cancer (UICC)* . Pada klasifikasi ini, pengukuran besar massa tumor (T) dapat dilakukan secara klinis (caliper), maupun radiologi (X-foto ataupun USG). N dinilai dari adanya pembesaran kelenjar getah bening regional dan M dinilai dari ada tidaknya metastase.¹⁵

2.2. Pengobatan Kanker Payudara

Pengobatan kanker payudara selama ini yaitu dengan pembedahan, radioterapi dan sitostatika. Pembedahan dan radioterapi bersifat terapi definitif lokal, sedangkan bila sel kanker telah menyebar/metastasis dilakukan dengan kemoterapi.¹⁶

Pemberian kemoterapi pada kanker payudara dilakukan dalam bentuk regimen. Regimen lini pertama yang masih direkomendasikan yaitu menggunakan adriamycin/doxorubicin (adriamycin based chemotherapy), dengan angka objective response (Partial Response dan Complete Response – CR/PR) sekitar 22% - 40%.^{17,18,19,20}

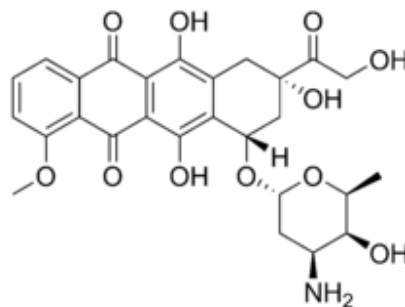
Terapi kanker sering dikombinasikan dengan terapi hormonal, serta adjuvant terapi dengan harapan meningkatkan efikasi terapi utama . Untuk keperluan tindakan operasi, sering dipergunakan regimen yang merupakan gabungan antara adriamycin dengan cyclophosphamide yang ditujukan sebagai ajuvant terapi untuk mengecilkan massa tumor (Neoadjuvant therapy) sebelum

operasi. Setelah dilakukan operasi dilanjutkan dengan regimen gabungan antara Adriamycin dengan derivat Taxane.^{21,22}

2.3. Adriamycin / Anthracyclin

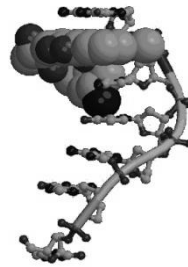
Adriamycin/anthracyclin adalah antibiotic golongan anthracyclin yang sitotoksik, yang masih direkomendasikan sebagai *first line chemotherapy* pada kanker payudara. Anthracyclin diisolasi dari kultur *Streptomyces peuceetius* varian *caesius*. Adriamycin mengandung rantai inti *naphthacenequinon* yang berikatan dengan gula amino (*daunosamine*) melalui ikatan glikosidik pada cincin atom ke 7.^{22,23,24,25}

Adriamycin yang tersedia di pasaran berupa adriamycin hidroklorida dengan nama kimianya adalah : *5,12-Naphthacenedione, 10[(3-amino-2,3,6-trideoxy-alpha-L-lyxo-hexopyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-8-(hydroxyacetyl)-1-methoxy-hydrochloride (8S-cis)*.^{26,27,28}



Gambar 1.1. Struktur kimia dari 5,12-Naphthacenedione, 10[(3-amino-2,3,6-trideoxy-alpha-L-lyxo-hexo-pyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-8-(hydroxyacetyl)-1-methoxy-hydrochloride (8S-cis).²⁹

Adriamycin berikatan secara interkalasi spesifik dengan asam nukleat DNA dobel heliks pada bagian planar inti anthracyclin. Cincin anthracyclin bersifat lipofil, tetapi ikatan pada cincin terakhir mengandung gugus hidroksil yang terikat pada senyawa gula, sehingga membentuk tempat yang hidrofily. Molekul bersifat amfoter yang memiliki grup cincin fenol yang bersifat sedikit asam. Struktur fungsi dasarnya adalah pada gula amino yang berikatan dengan membrane sel sebagai plasma protein.^{29,30}



Gambar 1.2. Struktur 3D dari ikatan interkalasi Adriamycin dengan salah satu *DNA Double Helix*.²⁸

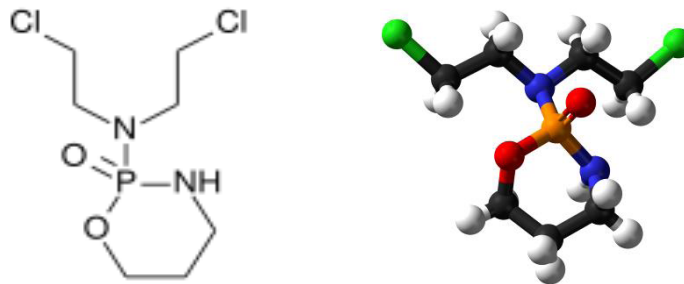
Efek sitotoksik adriamycin pada sel-sel maligna, dan efek toksik pada berbagai organ berhubungan dengan interkalasi pada nukleotida dan aktivitas ikatan pada membran lipid sel. Efeknya terhadap hematopoesis yaitu netopenia, anemia dan trombositopenia.

Penelitian terbaru menyebutkan bahwa Adriamycin memiliki afinitas ikatan yang kuat terhadap proteasom dan menghambat aktivitas proteasom. Adriamycin juga diketahui dapat mengaktifkan enzim *caspase* yang dapat menginduksi apoptosis suatu sel maligna. Mekanisme molekuler yang pasti belum diketahui.^{29,30}

2.4. Cyclophosphamide

Cyclophosphamide disebut juga cytophosphane, yang merupakan *ankylating agent* dari golongan *nitrogen mustard* dalam kelompok *oxazophorin*. *Ankylating antineoplastic agent* adalah *ankylating agent* yang berikatan dengan kelompok alkyl pada DNA. Zat ini menghentikan pertumbuhan tumor dengan cara *cross-link* baik *interstrand* maupun *intrastrand* di basa *guanin* posisi N-7 pada DNA *double helix*, ikatan ini menyebabkan DNA akan terpisah/pecah, sehingga sel gagal membelah dan mati.^{31,32}

Efek utama dari cyclophosphamide adalah pada metabolitnya yaitu *phosphoramidate mustard* produk toksik lain yaitu *acrolein*. Metabolit ini terjadi hanya pada sel-sel yang mengandung sedikit *Aldehyde dehidrogenase (ALDH)*.³² Pemberian dalam dosis tinggi dapat mengakibatkan pansitopenia dan cystitis

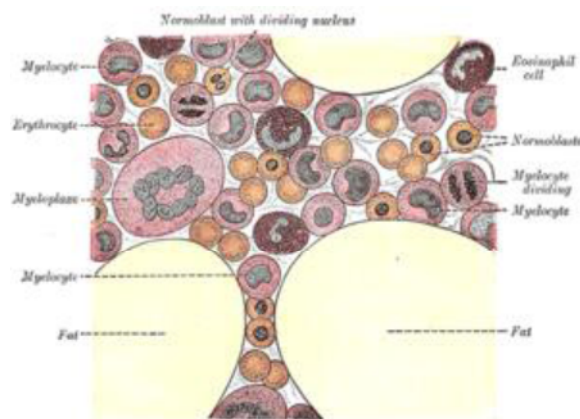


Gambar 1.3 Struktur kimia Cyclophosphamide (*N,N*-bis(2-chloroethyl)-1,3,2-oxazaphosphan-2-amine 2-oxide).³¹

2.5. Sumsum Tulang

Sumsum tulang merupakan jaringan yang terdapat pada ruang berongga di dalam tulang. Pada orang dewasa sumsum tulang memproduksi sel-sel darah baru. Beratnya sekitar 4% dari total seluruh berat tubuh.

Terdapat dua macam sumsum tulang, yaitu sumsum tulang merah (tersusun dari jaringan myeloid) dan kuning (tersusun dari sel-sel lemak). Pada saat lahir semua sumsum tulang merupakan sumsum tulang merah dan dengan bertambahnya umur sebagian berubah menjadi sumsum tulang kuning.



Gambar 1.4. Skema histologis sel-sel di sumsum tulang.³³

Stroma pada sumsum tulang merah bukan hanya jaringan yang berfungsi sebagai tempat hematopoiesis namun juga menghasilkan stem sel yang dapat berdiferensiasi menjadi bermacam sel. Tiga tipe stem sel yaitu:

1. Hematopoetic stem sel : sel darah putih (*myelopoiesis*), sel darah merah (*erithropoiesis*) dan platelet (*megakaryocytes*.)

2. Mesenkim stem sel : berdiferensiasi menjadi osteoblast, chondrosit, mielosit dan sel-sel lain.
3. Endotel stem sel

Sel mielosit di sumsum tulang jumlahnya antara 60-75% dari seluruh sel, terdiri atas neutrofil 49-65%, eosinofil 1.2-5.3%, dan basofil <0.2%. Rincian nilai normal untuk kelompok netofil sebagai berikut:

Kelompok netrofil

1. Myeloblas : 0.5 - 1.0 %
2. Promyelosit : 1 – 2 %
3. Myelosit : 5 – 10 %
4. Metamielosit : 15 – 20 %
5. Netrofil batang : 20 – 30 %
6. Netrofil segmen : 30 – 50 %

Rata-rata jumlah neutrofil sendiri yaitu $58 \times 10^3 / \text{mm}^3$.³³

Susunan normal dari sumsum tulang bisa berubah oleh keganasan, infeksi seperti Tuberculosis, menyebabkan penurunan produksi sel darah dan platelet. Sedangkan kanker pada sel progenitor seperti leukimia menyebabkan produksinya meningkat. Paparan radiasi dan khemoterapi akan membunuh sel yang cepat membelah di sumsum tulang yang akibatnya akan menurunkan sistim imunitas.

Efek obat khemoterapi terhadap sumsum tulang normalnya berlangsung temporer. Perubahan terjadi beberapa hari setelah khemoterapi, dan mencapai puncaknya antara hari 10-14 dan kembali ke kondisi awal setelah seminggu atau lebih.

Produksi sel darah putih merupakan proses yang paling sensitif terhadap zat sitotoksik, perubahan terhadap sel darah merah dan platelet umumnya terjadi lambat dan hanya nampak setelah beberapakali pemberian khemotereapi. Jumlah sel darah putih menurun dimulai hari ke 5-7 setelah khemoterapi dan level terendah dicapai setelah hari ke 14. Jumlahnya akan kembali normal pada akhir minggu ketiga.

Sampel pemeriksaan sumsum tulang didapat dari biopsi (trephine biopsi) dan aspirasi. Masing-masing mempunyai keuntungan dan kerugian. Keuntungan dari teknik aspirasi yaitu cepat, memperikan kuantitas bermacam sel yang cukup, dan dapat dijadikan bahan untuk studi lanjut seperti genetika molekular dan flow cytometry. Kerugiannya yaitu tidak menggambarkan keseluruhan dari sel. Keuntungan dari teknik biopsi yaitu memberikan gambaran sel dan stroma, menggambarkan keseluruhan sel dan dapat menjelaskan kondisi dimana pada teknik aspirasi tidak didapatkan sel darah. Kerugian dari teknik ini yaitu pembuatannya membutuhkan proses lama.

2.6. Respon Immunologik Terhadap Sel Tumor

Fungsi sistem imun adalah fungsi protektif dengan mengenal dan menghancurkan sel-sel abnormal itu sebelum berkembang menjadi tumor atau membunuhnya kalau tumor itu sudah tumbuh. Sel tumor akan mengekspresikan

molekul yang akan dikenali sebagai benda asing.. Peran sistem imun ini disebut *immune surveillance*, oleh karena itu sel-sel efektor seperti sel makrofag, sel T-sitotoksik (CTL) dan sel-NK harus mampu mengenal antigen tumor dan memperantarai/menyebabkan kematian sel-sel tumor.^{34,35}

Tumor dapat merangsang *sistem* imun dengan ditandai peningkatan ekspresi MHC dan *Interseluler Adhesion Molecule* (ICAM), yang mengindikasikan sistem imun yang aktif. Sel imun yang berada disekitar sel kanker dan berperan dalam perondaan terhadap kanker adalah limfosit T sitotoksik (CTL), Sel-NK (*Natural Killer*) dan makrofag. Setelah mengenal sel kanker sebagai sel asing, ketiga sel imun tersebut akan membunuh sel kanker.

Sel CTL dan sel-NK melakukan cara sitotoksitas yang sama yaitu dengan mengeluarkan perforin sebagai *Pore forming factor* dan melepaskan *granzyme* sebagai granul sitotoksiknya, sedangkan makrofag berfungsi sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC). Dalam memproses antigen tumor *in vivo* akan melibatkan baik respon imun humoral maupun seluler. Sampai saat ini belum ada bukti antibodi secara sendiri dapat menghambat perkembangan / pertumbuhan sel tumor. Dengan demikian respon imun humoral dalam bentuk antibodi terhadap tumor selalu memerlukan bantuan efektor imun seluler.^{34,35}

2.6.1. Sel Natural Killer (NK) sebagai efektor anti tumor

Sel-NK merupakan komponen utama dari *immune surveillance*, yang dapat bekerja sebagai sel efektor dari imunitas natural maupun spesifik / adaptif. Mekanisme Efektor sel-NK mirip dengan sel T- sitotoksik (CD8), yang membedakan adalah bahwa sel-NK melakukan sitotoksitas terhadap sel tumor

yang kurang mengekspresikan molekul MHC kelas I “(MHC-unrestricted manner)”. Secara *in vitro*, sel-NK dapat melisis sel terinfeksi virus dan *cell line* dari tumor terutama tumor hematopoetik. Sebagian dari populasi sel-NK dapat melisis sel target yang diopsonisasi oleh antibodi, terutama dari kelas IgG karena sel-NK memiliki reseptor Fc γ RIII atau CD16 untuk Fc dari IgG. Kapasitas tumorisidal dari sel-NK akan ditingkatkan oleh berbagai *sitokin*, terutama IFN- γ .³⁴

Sitotoksitas alami yang diperankan oleh sel-NK merupakan mekanisme efektor yang sangat penting dalam melawan tumor. Sel-NK adalah sel efektor dengan sitotoksitas spontan terhadap berbagai jenis sel sasaran; sel-sel NK ini tidak memiliki sifat-sifat klasik dari makrofag, granulosit maupun CTL, dan sitotoksitasnya tidak bergantung pada MHC.

Sel-NK dapat berperan baik dalam respons imun nonspesifik maupun spesifik terhadap tumor, dapat diaktivasi langsung melalui pengenalan antigen tumor atau sebagai akibat aktivitas sitokin yang diproduksi oleh limfosit T spesifik tumor. Mekanisme lisis yang digunakan sama dengan mekanisme yang digunakan oleh sel T CD8⁺ untuk membunuh sel. Sel-NK tidak mengekspresikan TCR dan mempunyai rentang spesifisitas yang lebar. Sel-NK dapat membunuh sel terinfeksi virus dan sel-sel tumor. Sel-NK tidak dapat membunuh sel yang mengekspresikan MHC, tetapi sebaliknya sel tumor yang tidak mengekspresikan MHC, yang biasanya terhindar dari lisis oleh CTL, justru merupakan sasaran yang baik untuk dibunuh oleh sel-NK. Sel-NK dapat diarahkan untuk melisis sel yang dilapisi *immunoglobulin* karena ia mempunyai reseptor Fc (FcRIII atau CD 16) untuk molekul IgG. Disamping itu penelitian-penelitian terakhir

mengungkapkan bahwa pengikatan sel-NK pada sel sasaran juga dapat terjadi melalui reseptor khusus yang berbeda dengan reseptor Fc, yaitu reseptor NKR-P1, yang mengikat molekul semacam lektin.³⁵

Aktivitas sel-NK dihambat oleh antigen HLA-G, apabila diekspresikan oleh sel tumor, mengakibatkan sel tumor terhindar dari upaya lisis oleh sel-NK. Walaupun antigen HLA-G jarang diekspresikan pada tumor, transkripnya berupa mRNA cukup sering dijumpai pada berbagai jenis tumor, sehingga diduga ekspresi antigen HLA-G dikontrol ditingkat pasca transkripsi. Apabila tumor tidak mengekspresikan antigen HLA-G, sulit baginya untuk menghindarkan lisis oleh sel-NK, sekalipun tumor telah berupaya menghindar dari lisis oleh sel T sitotoksik dengan tidak mengekspresikan MHC.

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 rangsangan yang terjadi secara bersamaan pada sel T dan makrofag yang memproduksi sitokin tersebut.¹⁹ Ketiga jenis IFN (α, β, γ) dapat meningkatkan fungsi sel-NK. IFN mengubah pre-NK menjadi sel-NK yang mampu mempermudah interaksi dengan antigen tumor dan lisis 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 resiko metastasis. Dari penelitian-penelitian itu

disimpulkan bahwa sitotoksitas alami dapat berperan dalam mencegah pertumbuhan kanker dan metastasis.³⁵

Peran sel-NK diaktifkan dengan stimulasi IL-2 dalam membunuh sel tumor. Sel-sel itu yang disebut *lymphokine activated killer cells* (LAK cells) dapat diperoleh *in vitro* dengan memberikan IL-2 dosis tinggi pada biakan sel-sel limfosit darah perifer atau sel-sel *Tumor Infiltrating Lymphocytes* (TIL) yang berasal dari penderita kanker. Sel-sel yang diaktifkan oleh limfokin (LAK cells) menunjukkan peningkatan aktivitas sitotoksik yang sangat jelas. Besar kemungkinan bahwa sel LAK dapat digunakan dikemudian hari dalam imunoterapi adaptif.^{35,36}

Sel-NK juga mempunyai peran penting dalam mencegah metastasis dengan mengeliminasi sel tumor yang terdapat dalam sirkulasi. Hal itu dibuktikan dengan berbagai penelitian. Salah satu diantaranya mengungkapkan bahwa 90-99% sel tumor yang dimasukkan intravena akan hilang dalam 24 jam pertama, dan hal ini mempunyai hubungan bermakna dengan jumlah dan aktivitas sel-NK. Percobaan menggunakan NK yang di-aktivasi dengan cyclophosphamide (cy) menunjukkan bahwa sel-sel itu gagal mencegah metastasis.

Setelah mengenal sel tumor dengan caranya masing-masing, CTL dan sel-NK melepas granula azurofilik. Granula ini akan menyelubungi sel target, kemudian akan bersatu dengan membrane sel target (*eksositosis*) .^{21,37} Granula CTL dan sel-NK mengandung *perforin*, *sitotoksin*, *serine esterase* (*granzyme*) dan *proteoglikan*. Perforin akan menimbulkan lubang pada membran sel target (sel

tumor), dimana lubang tersebut merupakan pintu masuk bagi molekul sitotoksik lainnya dalam sitoplasma dan inti sel yang menyebabkan kematian dari sel target.

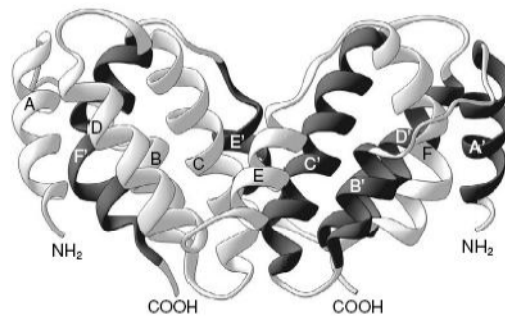
Saat membunuh sel target ini melibatkan ekspresi permukaan FAS reseptor yang dipengaruhi ligan, yang dapat mengakibatkan *cross link* sel target sehingga memicu kematian endogen (dikaitkan dengan apoptosis) secara bersama-sama jalur granula (*eksositosis* dan FASL). Granzym akan mengaktifkan procaspase endogen pada sel target. Aktifitas *caspace* merupakan bagian dari jalur kematian *apoptotic* pada umumnya. *Inhibitor caspace* akan menghambat *apoptosis* dari jalur rusaknya nucleus; tetapi tidak menghambat apoptosis karena kerusakan yang bukan dari kerusakan inti tetapi hilangnya mitokondria potensial.³⁵

2.6.2. Interleukin 12 (IL-12)

IL-12 tersusun dari 1 pasang 4 alpha heliks. Yang merupakan heterodimer sitokin yang dikode oleh 2 gen yang terpisah yaitu IL-12A (p35) dan IL-12B (p40). Bentuk aktif heterodimer dan homodimer dari p40 dibentuk oleh IL-12 yang mempunyai peran penting pada aktifitas dari sel natural killer dan limfosit T. IL-12 menjadi mediator perantara dari aktifitas sitotoksik dari NK sel dan CD 8+ sitotoksik limfosit T. Yang juga kelihatan menjadi ikatan antara IL-12 dan signal transduksi pada NK sel. Yang diikuti sintesis protein. IL-12 juga mempunyai aktifitas anti-angiogenic, itu berarti bisa menghambat pembentukan pembuluh darah baru. IL-12 akan meningkatkan produksi IFN yang akan meningkatkan kemokin CXCL-10 yang akan menghambat neovaskularisasi.³⁶

2.6.3. Interferon- γ (IFN- γ)

IFN- γ disebut juga interferon tipe 2, 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⁺, CD8⁺ dan sel NK.^{34,35,36}



Gambar 1.5. Struktur 3D dari Interferon- γ .³⁴

Interferon- γ berfungsi dalam imunoregulasi sebagai berikut:

1. IFN- γ akan meningkatkan sel T untuk berdiferensiasi.

Disini IFN- γ akan memacu naïve CD4⁺ untuk berdiferensiasi ke subset sel Th1 dan menghambat proliferasi Th2 pada percobaan dengan mencit. Efek ini mungkin terjadi karena diperantarai oleh aktivasi sel fagosit mononuklear yang melepaskan IL-12 dan sel T yang mengekspresikan reseptor IL-12. IFN- γ juga dibutuhkan untuk maturasi sel T sitolitik CD8⁺.

2. 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.

3. IFN- γ memacu aktivitas sitolitik dari sel-sel NK yang sangat berperan pada imunologi tumor.
4. 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. Pada mencit *knockout* yang telah dirusak IFN- γ nya atau dirusak reseptor IFN- γ nya menunjukkan defek imunologis yang berat.

Interferon terdiri dari 2 tipe yaitu tipe I dan tipe II (IFN- γ). Peran biologik Interferon tipe I adalah ³⁵:

1. Menghambat replikasi virus
2. Menghambat proliferasi sel
3. Meningkatkan kemampuan lisis dari sel-NK
4. Dapat memodulasi ekspresi molekul MHC.

Peran biologik tipe II adalah :

1. Aktivator sel mononuklear yang poteMeningkatkan ekspresi MHC I
2. Membantu diferensiasi pada limfosi T dan B
3. Mengaktifasi neutrofil
4. Menstimulasi aktifitas sitolitik sel-NK
5. Merupakan aktivator sel-sel endotel vaskuler.

2.6.4. Perforin

Setelah CTL/sel-NK mengenali target sel spesifik, terjadi ikatan (synapse) dalam dua domain, yang pertama adalah ikatan signal *signaling domain* dan yang lainnya adalah *secretory domain* . Synapse ini sangat kuat untuk mencegah kebocoran molekul sitolitik yang disekresikan ke sel target, tetapi pada keadaan aktivasi CTL/sel-NK yang kuat akan terjadi kebocoran juga. Hal ini yang dapat kita ukur dalam darah (nMol) atau pada jaringan dengan pengecatan Imunohistokimia sebagai indikator aktifitas CTL/sel-NK.

Perforin sangat diperlukan untuk membuka jalan agar granzyme sampai ke sitosol. Pada model yang terdahulu, perforin mengalami reaksi homopolimerasi pada membran plasma dengan bantuan ion Ca^{2+} untuk membuat lubang pada membran plasma, lubang yang terbentuk untuk dapat bisa memasukkan granzyme diameternya ± 50 nanometer. Pada waktu disintesa, perforin tidak akan merusak membran intraseluler karena belum aktif. Di dalam granula sitotoksik perforin terikat dengan serglycin (matriks proteoglikan) dan calreticulin (inhibitor perforin), setelah proses eksositosis, perforin akan terdisosiasi dari polimerasi serglycin dan calreticulin dan terpolimerasi yang akan masuk ke dalam membran plasma sel target.^{35,36}

2.6.5. Granzyme

Granzym merupakan suatu senyawa serin esterase yang dilepaskan dari granula sitotoksik CTL dan sel NK. Granzym dapat menginduksi apoptosis. Granzym masuk ke intraseluler sel target dengan bantuan perforin sebagai pore

forming factor. GrB kompleks (GrB, perforin, dan glikoprotein lain masuk ke dalam sel melalui reseptor mannose 6-phosphat.

Granzym ini akan mengaktifkan caspase terutama caspase-3 di mana akan mengaktifkan Dnase. Granzym akan mengaktifkan protein Bid, yang bersama dengan protein Bax dan Bak akan meningkatkan permeabilitas membran mitokondria. Dengan bertambahnya permeabilitas mitokondria, akan dilepaskan enzim cytochrom-c yang akan mengaktifkan caspase-9, Smac/Diablo dan Omi/HtrA2 yang akan mensupresi protein inhibitor apoptosis (IAP's protein). Granzym pada plasma dapat diukur dengan metoda ELISA, sedangkan pada sel tumor dapat diukur dengan pemeriksaan immunohistokomia.³⁷

2.7. Apoptosis

Apoptosis adalah suatu kematian sel yang terprogram atau *progammed cell death*. Tujuannya yaitu dalam rangka menjaga keseimbangan jaringan dan organ yang disusun oleh sel tersebut. Apoptosis berasal dari dua suku kata bahasa latin yaitu apo dan ptosis yang memiliki arti gugur.

Proses apoptosis dikontrol oleh sinyal-sinyal sel yang berbeda-beda, baik yang berasal dari luar sel (jalur ekstrinsik) atau intraseluler (jalur intrinsik). Sebelum enzim-enzim melakukan proses-proses kematian sel, sinyal apoptosis harus diterima terlebih dahulu oleh *death pathway* melalui protein-protein regulator. Protein regulator ini dapat mengatur apakah sel tersebut harus mati atau belum perlu mati. Target utama sinyal apoptosis adalah mitokondria

fungsional atau langsung ke jalur apoptosis melalui protein *adapter*. Proses apoptosis ini membutuhkan energi dan berfungsinya organel sel.³⁸

Setelah terjadi aktivasi akan menyebabkan reaksi enzimatis intraseluler. Enzim, protein, dan DNA akan terurai, dan tidak ada komponen intraseluler yang terdispersi ke ekstraseluler. Sel yang mengalami apoptosis akan mengeluarkan signal ke ekstraseluler berupa phospholipid pada membran selnya yang dapat dikenali oleh sel-sel imun, terutama makrofag.

Ada banyak stimulasi yang dapat menginduksi apoptosis. Stimulasi utama adalah agent kemoterapi, ultraviolet/radiasi, panas, *osmotic imbalance*, dan *Nitric Oxide*. Menurut jenis triger dan tipe selnya, ada banyak jalur signal untuk mengaktifasi apoptosis. Mitokondria merupakan organel sel yang penting. Protein pro apoptosis yang targetnya mitokondria akan membuat kerusakan dengan cara yang berbeda-beda. Kerusakan dapat berupa bengkaknya membran mitokondria sehingga timbul pori-pori atau meningkatnya permeabilitas membran mitokondria sehingga akan terjadi kebocoran protein-protein yang memicu apoptosis.³⁸

Protein mitokondria pemicu apoptosis di antaranya adalah SMACs (second mitochondria-derived activator of caspases) yang akan dilepaskan ke sitosol bila terjadi kenaikan permeabilitas membran mitokondria. SMACs ini akan berikatan dengan *inhibitor of apoptosis protein (IAP)* sehingga tidak aktif. IAP juga akan menekan aktivitas *cystein protease (caspase)*.

Cytochrome juga akan dilepaskan dari membran mitokondria. Cytochrome setelah dilepaskan akan berikatan dengan *Apaf-1* dan ATP dan pro caspase-9

membentuk kompleks protein dengan nama apoptosome. Hal ini akan mengaktifkan pro-caspase 9.

MAC sendiri dapat diatur oleh bermacam-macam protein yang dikode oleh gen anti-apoptosis dalam famili Bcl-2 yang homolog dengan gen ced-9. Protein Bcl-2 dapat menghentikan apoptosis meskipun cytochrom-c sudah dilepaskan oleh mitokondria.³⁸

Kerusakan DNA dipicu oleh enzim caspase aktif, di mana caspase ini merupakan suatu molekul protein 10 dan 20 kD berupa protease cystein. Saat ini sudah dikenal \pm 12 jenis caspase. Protein target dari caspase ini adalah protein *DNA repair system* [seperti (ADP-ribose)-polymerase], protein struktural/sitoskeletal (seperti lamin, actin, cytokeratin, dll) , dan onkoprotein (terutama Rb protein). Yang terakhir diketahui, caspase juga akan mengaktifkan Dnase yang menyebabkan kerusakan DNA selama apoptosis. Sehingga yang akan terjadi adalah melisutnya organel dan inti sel.

Caspase (terutama caspase 8 dan 10) dapat diaktifkan oleh granzyme maupun suatu katalisator protease yaitu FLICE (FADD-Like IL-1 Converting Enzyme) yang berikatan oleh FADD (Fas-Associated Death Domain), pada reseptor CD95/Fas setelah kontak dengan Fas ligand. Pengaktifan caspase melalui reseptor CD95/Fas terjadi bila kontak dengan Fas ligand. Fas ligand ini bisa berasal dari ekspresi protein antigen dari CTL, sitokin TNF, ataupun metabolit ligand pada Fas reseptor seperti polyphenol yang terkandung dalam *tanaman obat*.^{35,38}

Apoptosis dapat diinduksi oleh CTL dan sel-NK yang diinduksi baik oleh *nonsecretory induced*, *ligand-induced*, dan *secretory induced* dengan granzyme melalui perantaraan sekresi perforin. Aktifasi *secretory induce* caspase dilakukan oleh CTL dan sel-NK oleh granula sitotoksiknya yang berisi protein *pore-forming* perforin (cytolysin) dan enzim famili dari serine protease yang bernama granzyme sebagai senjata dari CTL/sel-NK. Granzyme ini terdiri dari granzyme B, granzyme A, C,D,E,F,G,H,K, dan M.³⁹

Secara mikroskopik apoptosis dapat diketahui dengan pengecatan HE, dengan melihat *apoptotic body* yang ada. *Apoptotic body* secara mikroskopik dengan pengecatan HE akan tampak sebagai sel tunggal bulat dengan gambaran kromatin yang terkondensasi berwarna basofilik, kadang gambaran kromatinnya terlihat pecah-pecah, dengan sitoplasma yang eosinofilik. Sering terlihat apoptotic body terpisah dari sel-sel sekitarnya yang intak dengan gambaran halo yang jelas. Pemeriksaan yang lebih akurat dapat dilakukan dengan *TUNEL Death End Colorimetric (TDEC)*.^{38,39,40}

2.8. *Phaleria macrocarpa*

Phaleria macrocarpa merupakan *nomenclature binomial* dari Mahkota Dewa dan termasuk dalam familia Thymelaeaceae. Umurnya dapat mencapai puluhan tahun dengan masa produktif 10-20 tahun. Tanaman ini dapat dijumpai tumbuh liar di daerah hutan pada ketinggian 10-1200 meter di atas permukaan laut dengan curah hujan sekitar 1000-2500 mm/tahun. *Phaleria macrocarpa* merupakan tumbuhan perdu dan dapat mencapai ketinggian 1-1,5 meter. Daunnya

termasuk daun tunggal yang saling berhadapan, warna hijau, dengan panjang 7-10 cm dan lebar 3-5mm. Bunga berwarna putih, tergolong bunga majemuk tersusun dalam kelompok 2-4 bunga. Buah terdiri dari kulit,daging,cangkang,dan biji. Ketebalan kulit buah 0,5-1,0 mm, tebal daging bervariasi. Cangkang berwarna putih dengan ketebalan mencapai 2 mm. Biji berbentuk lonjong dengan garis tengah 1 cm. Akar termasuk akar tunggang, batang bentuk bulat.

Kajian pustaka yang telah ada menyebutkan bahwa genus *Phaleria* umumnya memiliki aktifitas antimikroba, hal ini berkaitan dengan toksisitas tanaman yang cukup tinggi untuk pertahanan diri. Adanya aktifitas antimikroba ini berhubungan dengan potensi antikanker terhadap sel pada siklus tertentu.

Ekstrak terhadap daging buah dan kulit biji *Phaleria macrocarpa* menunjukkan adanya zat aktif alkaloid, terpenoid, saponin, dan polyphenol berupa *gallic acid* (*GA* : *3,4,5-trihydroxybenzoic acid*).³⁷ Pengujian terhadap toksisitas ekstrak tanaman dilakukan dengan melihat tingkat mortalitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach setelah diinkubasi selama 24 jam. Hasilnya toksisitas sangat tinggi, dengan nilai konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% larva udang (LC50) berkisar antara 0,1615 – 11,8351 µg/ml (semakin kecil nilai LC50, semakin toksik tanaman tersebut dan semakin berpotensi untuk memiliki aktifitas biologi / efek farmakologi), dengan batas aktifitas biologi tanaman adalah $LC50 < 1000$ µg/ml. Penelitian yang dilakukan terhadap sel Hela, menunjukkan bahwa *Phaleria macrocarpa* mempunyai efek sitotoksik yang cukup kuat. *Phaleria macrocarpa* mempunyai efek sitotoksik yang bermakna dibandingkan efek sitotoksik Doxorubicin sebagai kontrol positifnya.

Penelitian dengan menggunakan sel kanker esofagus (TE-1) terlihat bahwa GA akan meningkatkan protein pro apoptosis Bax dan menurunkan protein anti apoptosis Bcl-2 serta Xiap. GA juga akan mengurangi *survival* dari *pathway* Akt/mTOR yang akan meningkatkan inisiasi apoptosis. Tetapi sebaliknya pada sel non-kanker (CHEK-1) terjadi hambatan protein pro apoptosis dan tidak terjadi penurunan ekspresi protein *survival*. *Phaleria macrocarpa* juga tidak mengganggu siklus sel serta akan meningkatkan apoptosis pada sub-populasi fase G1, sehingga diperkirakan bahwa *Phaleria macrocarpa* tidak berbahaya bagi sel normal. Jadi *Phaleria macrocarpa* tidak hanya bekerja secara spesifik pada saat sel mengalami mitosis.

Peneliti di Gamaleya Institute of Microbiology and Epidemiology, Moscow, Russia dan Chittaranjan National Cancer Institute, Kolkata, India – yang meneliti efek kandungan polyphenol pada herbal medicine – mengemukakan bahwa poliphenol alamiah dapat menstimulasi produksi Interferon- γ (IFN- γ) dalam suatu populasi immunosit, yang sangat penting dalam memacu aktivasi CTL's dan sel NK pada sistem perondaan imun terhadap sel-sel kanker.¹⁷ Sel imun yang berperan besar dalam perondaan imun terhadap kanker adalah CTL, Sel-NK (*Natural Killer*). Setelah sel kanker dikenal sebagai sel asing, sel imun tersebut akan menghancurkan sel kanker. Sel CTL dan sel NK melakukan cara sitotoksisitas yang sama yaitu dengan mengeluarkan *perforin* dan *granzyme*, di mana perforin ini sebagai *pore forming* untuk memasukkan *granzyme* ke dalam sitosol. Akibat aktifitas sel-sel efektor immune tersebut maka sel-sel target akan mengalami apoptosis.

Polyphenol dalam tanaman obat dilaporkan mempunyai kemampuan untuk menghambat aktivasi *Nuclear Factor Kappa B* (NF- κ B), suatu *transcription factor* yang berperan penting dalam regulasi molekul pembentukan protein anti apoptosis.⁴⁴ Polyphenol juga akan mempunyai efek menginduksi terjadinya apoptosis melalui jalur TNF- α , di mana apoptosis sel akan dimulai dari *Fas / TNF-RI receptor*.^{41,42}

Selamat B dkk melakukan penelitian pada mencit C3H yang menderita adenokarsinoma mamma, di mana diberikan ekstrak *Phaleria macrocarpa* dengan pelarut ethanol melalui cara sokletasi. Perlakuan selama 3 minggu dengan dosis 0,0715 mg /hari atau setara 5 gram crude/hari yang sudah diberikan pada manusia, mendapatkan hasil bahwa ekspresi perforin CTL dan sel-NK serta indeks apoptosis sel tumor (dengan pengecatan HE) mengalami peningkatan yang signifikan dibandingkan dengan kontrol, dan terjadi hambatan pertumbuhan diameter tumor yang signifikan. Pada pemberian dosis sampai dengan 0,0140 mg/hari tidak ditemukan adanya toksisitas/kerusakan organ vital seperti ginjal, hepar, lien, dan otot jantung.

Penelitian lain oleh Selamat B dkk terhadap ekspresi VEGF tumor pada pemberian secara kombinasi Adriamycin, cyclophosphamide dan ekstrak *Phaleria macrocarpa* 0,0715 mg /hari dengan pelarut ethanol terdapat perbedaan yang signifikan pada kelompok yang diberi ekstrak dan tidak menyebabkan peningkatan SGOT dan SGPT yang bermakna, serta tidak ditemukan adanya toksisitas/kerusakan organ vital seperti ginjal, hepar, lien, dan otot jantung, serta lekopenia.