

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kanker

Kanker merupakan penyakit yang kejadiannya semakin tahun semakin bertambah. Berdasar temuan dari WHO (2013) didapatkan bahwa kanker yang paling banyak didiagnosis di seluruh dunia adalah kanker paru-paru (1,8 juta atau 13,0%), kanker payudara (1,7 juta atau 11,9%) dan kolorektum (1,4 juta atau 9,7%) (WHO, 2013).

Prevalensi kanker di Indonesia pada tahun 2012 mencapai 1,3 per 1.000 orang, meningkat pada tahun 2013 dengan 1,4 per 1.000 orang (Riskesdas, 2013). Prevalensi penyakit kanker di Jawa Tengah adalah 2,1 per 1.000 orang, tertinggi kedua setelah Jogjakarta yaitu 4,1 per 1.000 orang dan diikuti dengan Bali dengan urutan ketiga yaitu 2,0 per 1.000 orang (Riskesdas, 2013).

Kasus penyakit kanker yang ditemukan di Provinsi Jawa Tengah pada tahun 2011 sebanyak 19.637 kasus, meningkat bila dibandingkan dengan tahun 2010 sebanyak 13.277 kasus, terdiri dari kanker serviks 6.899 kasus (35,13%), kanker payudara 9.542 kasus (48,59%), kanker hepar 2.242 (11,42%), dan kanker paru 954 kasus (4,86%). Kanker payudara menduduki pertama (Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Tengah, 2012).

2.1.1. Kanker Payudara

Kanker payudara adalah sekelompok sel abnormal pada payudara yang terus tumbuh berlipat ganda dan pada akhirnya sel-sel ini membentuk benjolan di payudara (Kasdu, 2005). Kanker payudara merupakan jenis tumor ganas yang dapat berasal dari kelenjar, saluran b kelenjar dan jaringan penunjang payudara (Sjamsuhidajat & de Jong, 2005). Kanker payudara terjadi karena ada kerusakan gen yang mengatur pertumbuhan dan differensiasi sel, sehingga sel ini tumbuh tak terkendali (Mardiana, 2004).

Usia penderita kanker payudara termuda adalah 20–29 tahun, tertua adalah 80–89 tahun, dan terbanyak adalah berumur 40–49 tahun dan letak terbanyak di kuadran lateral atas (Wiknjosastro, 2007).

2.1.2. Mekanisme Kanker Payudara

Kanker payudara berasal dari unit sekretorius payudara, yaitu unit duktus-lobulus terminal. Beberapa faktor risiko kanker payudara telah diketahui saat ini antara lain faktor genetik (5 - 7%), riwayat keluarga menderita kanker payudara, riwayat pernah menderita kanker payudara sebelumnya, faktor menstruasi dan reproduksi, paparan radiasi, penggunaan terapi sulih hormon, alkohol dan diet tinggi lemak (Randhawa, 2008). Meskipun telah banyak diketahui faktor risiko, ternyata 75% kanker payudara tidak ada hubungan dengan faktor risiko yang ada (Yi T, dkk. 2008).

Faktor-faktor etiologi tersebut secara garis besar bisa dikelompokkan menjadi tiga, yaitu:

1. Faktor genetik.

Setiap kanker bisa dipandang sebagai proses genetik karena kanker terjadi dari perubahan genetik atau mutasi. Hanya sebagian kecil kanker herediter, sisanya adalah sporadik dan berhubungan dengan mutasi somatik yang didapatkan selama hidup. Individu yang membawa mutasi genetik, lahir satu langkah lebih dekat dengan timbulnya tumor dan mempunyai kecenderungan menderita kanker pada usia muda (Kamal & Dana, 2006).

Pada kanker payudara, proses ini bisa berlangsung mulai dari mutasi genetik, hiperplasia, karsinoma *in situ*, kemudian kanker metastatik. Pada kanker payudara herediter, terjadi pertama kali adalah mutasi yang berhubungan dengan repair DNA dan apoptosis (Hasanzadeh, dkk. 2011).

2. Faktor hormonal.

Hormon estrogen merupakan hormon utama pemicu timbulnya kanker payudara. Pada wanita dengan kadar estrogen yang tinggi seperti nuliparitas, *menarche* awal, usia paparan estrogen lama, tidak laktasi dan terapi sulih hormone pada menopause akan mempunyai risiko lebih tinggi terkena kanker payudara. Estrogen dan progesteron mempengaruhi perkembangan dan perubahan dari kelenjar payudara yang memiliki berbagai macam reseptor hormon. Paparan estrogen akan meningkatkan faktor-faktor proliferasi sel dan bila tidak terkendali secara biologis akan berkembang menjadi kanker mengikuti tahapan-tahapannya (Salomi, dkk. 1992).

3. Faktor lingkungan

Paparan agen karsinogenesis dari lingkungan dapat berupa zat kimia, zat makanan, infeksi dan faktor fisik seperti radiasi radioaktif, dan trauma (Badary, dkk. 2011). Beberapa faktor lingkungan seperti bahan kimia organoklorin, lapangan elektromagnetik, merokok aktif dan pasif dan penggunaan implan silikon sampai saat ini belum terbukti menaikkan risiko terjadinya kanker payudara (Padhye, dkk. 2008).

2.2. Anemia

Anemia adalah suatu defisiensi dari kadar hemoglobin darah ataupun jumlah maupun volume sel darah merah (Ludwig, 1995). Anemia sering dijumpai pada penderita kanker (Henry, 1998). Terjadinya anemia pada kanker dapat langsung disebabkan oleh efek langsung dari tumor, efek dari hasil produk tumor dan efek dari pengobatan tumor itu sendiri (Saba, 1998). Insiden anemia pada penderita kanker bervariasi, tergantung pada jenis tumor dan jenis terapi yang diberikan (Muthalib & Atmakusuma, 2001). Insiden anemia pada penderita kanker sebesar 50% dan meningkat menjadi di atas 90% pada kanker stadium lanjut atau kanker yang diobati dengan kemoterapi atau radioterapi². Peneliti lain mendapatkan insiden anemia sebesar 78% pada leukemia, 62% pada mieloma multipel dan 42-72% pada limfoma.

2.2.1. Mekanisme Anemia pada Kanker

Penderita kanker dengan anemia ringan biasanya tanpa gejala klinis atau pada saat beraktivitas dapat dijumpai takikardi, palpitasi, sesak nafas dan kelelahan ringan. Gejala klinis pada penderita kanker dengan anemia berat adalah dijumpai sesak nafas dan palpitasi pada saat istirahat, kelelahan berat dan tidak mampu melakukan aktivitas (*exercise intolerance*). Muthalib A, dkk (2001) mengelompokkan tanda dan gejala klinis anemia berdasarkan anemia ringan, sedang, dan berat (tabel 2.2.1). Pada pemeriksaan fisik dapat dijumpai tanda-tanda gagal jantung kongestif (Kumar, 2000).

Ringan (Hb >10-12 g/dl)	Sedang (8-10 g/dl)	Berat (<8 g/dl)
Kelelahan	Fatigue	<i>Overwhelming</i>
Peningkatan detak jantung	Sulit konsentrasi	<i>Fatigue / exhaustion</i>
Penurunan perfusi jaringan	Detak jantung >100/m	<i>Dizziness</i>
Dilatasi sistem vaskuler	Berdebar-debar	Vertigo
Ekstraksi O ₂ jaringan naik	- Dispnu saat aktivitas - Pucat	-Depresi-gangguan tidur -Dispnu saat istirahat

Gambaran hematologi anemia pada kanker adalah sama seperti gambaran hematologi dari anemia pada penyakit kronis yaitu adanya anemia normokrom normositer, serum iron yang menurun, total iron binding capacity yang menurun, dan serum feritin yang meningkat (Fitzsimons & Brock, 2001).

Anemia karena penyakit kronis ditandai Hipoplasia eritroid pada sumsum tulang, memendeknya umur eritrosit, menurunnya pemakaian kembali zat besi, rendahnya eritropeietin tidak sesuai dengan derajat anemianya dan diperantarai sitokin (Provan, dkk. 1994).

Terjadinya anemia pada kanker dimulai dengan diaktivasiya sistem imun tubuh mekropage oleh tumor, kemudian mekropage merangsang produksi sitokin berupa peningkatan interleukin-1 (IL-1) *tissue necrosis factor* (TNF) dan interferon gamma (IFN γ), selanjutnya sitokin akan bereaksi dengan limfosit, sel endotel dan fibroblas, akibatnya akan diproduksi mediator supresor eritrosit langsung pada sel efektor. Selanjutnya akan menyebabkan terjadinya penurunan produksi

eritropoietin, penurunan *blast forming unit-erythrocyte* (BFU-E) dan *colony forming unit-erythrocyte* (CFU-E). Gangguan metabolisme Fe dan terjadinya pemendekan umur eritrosit. Akhirnya akan terjadi anemia (Muthalib, dkk. 2001).

Anemia pada penderita kanker dibagi dalam beberapa tingkatan. *The national cancer institute dan cooperative oncology groups* membagi anemia menjadi 4 tingkatan (tabel 2.2).

Tabel 2.2. Tingkatan anemia

Tingkat 1, ringan (Hb 10 gr/dL sampai < dbn)
Tingkat 2, sedang (Hb 8-10 g/dL)
Tingkat 3, serius/berat (Hb 6,5-7,9 g/dL)
Tingkat 4, <i>life threatening</i> (Hb < 6,5 g/dL)

Anemia pada penyakit kanker terjadi karena aktivasi sistem imun dan sistem inflamasi oleh keganasan tersebut, serta beberapa sitokin yang dihasilkan oleh sistem imun dan inflamasi seperti interferon (INF). Tumor Necrosis Factor (TNF) dan interleukin-1 (IL-1) merupakan bahan-bahan yang merangsang untuk terjadinya anemia. Di samping itu, keganasan tersebut juga dapat mempunyai efek langsung untuk terjadinya anemia (Denz H 1990).

Pada keganasan hematologi didapati adanya kadar INF- γ dan neopterin, suatu petanda adanya aktivasi imunitas seluler. Kadar neopterin berhubungan nyata dengan kadar INF- γ dan berhubungan terbalik dengan hemoglobin dan besi (Denz H 1990). Hubungan ini menandakan adanya aktifitas imunitas seluler dan mungkin adanya hubungan antara aktivasi makrofag anemia pada pasien ini. Konsentrasi INF- γ juga meningkat pada penyakit kronik dan juga berhubungan dengan aktivitas penyakitnya (Denz H 1990)

Kadar TNF tergantung pada jenis keganasan dan aktivitasnya. Pasien dengan penyakit yang kadar TNF-nya akan meningkat, walau penyakitnya kadang tidak dapat diketahui. Sesuai dengan penemuan dari beberapa studi klinis maupun eksperimental, paparan kronik pada TNF dapat menyebabkan anemia. Pada fase 1 studi klinis, pasien yang diobati dengan TNF dilaporkan menderita anemia (Denz H 2002)

Interleukin-1 (IL-1). Seperti juga TNF, adalah sitokin yang mempunyai kerja yang luas di dalam proses respon imun dan inflamasi. Konsentrasi IL-1 juga meningkat pada *arthritis rheumatoid* dan penyakit kronik lain yang berhubungan dengan anemia karena penyakit kronik (ACD= *Anemia of chronic disease*) (Hook j.j 2002).

Massa sel darah merah secara normal ditentukan oleh umur dari sel darah merah itu dan dari kecepatan produksinya. Anemia terjadi karena adanya ketidakseimbangan antara kedua faktor tersebut. Pada anemia karena kanker, kedua faktor tersebut sangat menentukan. Yang paling penting adalah adanya kegagalan relatif dari sumsum tulang dalam meningkatkan produksi sel darah merah guna mengimbangi pendeknya sel darah merah tersebut (Hook j.j 2002)

2.3. Sistem Imun

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. Peran sistem imun ini disebut *immune surveillance*, oleh karena itu maka sel – sel efektor seperti limfosit B, T- sitotoksik dan sel NK harus mampu mengenal antigen tumor dan memperantarai/menyebabkan kematian sel – sel tumor (Lands, 1982).

Beberapa bukti yang mendukung bahwa ada peran sistem imun dalam melawan tumor ganas diperoleh dari beberapa penelitian, diantaranya yang mendukung teori itu adalah :

1. Banyak tumor mengandung sel – sel mononuklear yang terdiri atas sel T, sel NK dan makrofag.
2. Tumor dapat mengalami regresi secara spontan.
3. Tumor lebih sering berkembang pada individu dengan imunodefisiensi atau bila fungsi sistem imun tidak efektif bahkan imunosupresi seringkali mendahului pertumbuhan tumor.
4. Tumor seringkali menyebabkan imunosupresi pada penderita. Bukti lain yang juga mendukung bahwa tumor dapat merangsang sistem imun adalah ditemukannya limfosit berproliferasi dalam kelenjar getah bening yang merupakan *draining sites* dari pertumbuhan tumor

disertai peningkatan ekspresi MHC dan *intercellular adhesion molecule* (ICAM) yang mengindikasikan sistem imun yang aktif (Lands, 1982).

Sebaran limfosit disekitar sel kanker secara histologik mempunyai nilai prognostik yang baik karena kecepatan pertumbuhan sel kanker akan menurun. Secara *in vitro*, beberapa sel imun di sekitar sel kanker terbukti dapat membunuh sel kanker disekelilingnya. Hubungan antara banyaknya limfosit yang ditemukan di antara kelompok sel kanker secara histologi dengan prognosis penderita telah ditunjukkan pada kanker leher rahim (M. Sopiudin, 2005).

Sel imun yang berada di sekitar sel kanker yang berperan dalam perondaan terhadap kanker adalah limfosit T sitotoksik (CTL), sel NK (Natural Killer) dan makrofag. Setelah mengenal sel kanker sebagai benda asing, ketiga sel imun tersebut akan menghancurkan sel kanker. Sel CTL dan sel NK melakukan cara sitotoksitas yang sama yaitu dengan mengeluarkan perforin, sedangkan makrofag menggunakan cara fagositosis. Proses 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 (Lands, 1982).

2.3.1. Limfosit T sebagai Efektor anti tumor

Subpopulasi limfosit T, limfosit T-*helper* dan T- sitotoksik sama-sama berperan dalam mengeliminasi antigen tumor. Sel yang mengandung antigen tumor akan mengekspresikan antigennya bersama molekul MHC kelas I yang kemudian membentuk kompleks melalui TCR (*T-cell Receptor*) dari sel T- sitotoksik (CD8), mengaktivasi sel T-sitotoksik untuk menghancurkan sel tumor tersebut. Sebagian kecil dari sel tumor juga mengekspresikan antigen tumor bersama molekul MHC kelas II, sehingga dapat dikenali dan membentuk kompleks dengan limfosit T-*helper* (CD4) dan mengaktivasi sel T-*helper* terutama *subset* Th1 untuk mensekresi limfokin IFN- γ dan TNF- α dimana keduanya akan merangsang sel tumor untuk lebih banyak lagi mengekspresikan molekul MHC kelas I, sehingga

akan lebih mengoptimalkan sitotoksisitas dari sel T-sitotoksik (CD8) (Lands, 1982). Konsep ini diaplikasikan dalam pengobatan tumor menggunakan TIL (*tumor infiltrating lymphocytes*), yaitu sel – sel mononuklear yang berinfiltrasi menuju ke sekitar jaringan tumor padat karena adanya reaksi inflamasi, sel tersebut diperbanyak secara kultur *invitro* dengan penambahan IL-2. Th 1 juga mensekresi IL-2, IL-3. Th 2 mensekresi IL-4, IL-5 dan IL-6. (Lands, 1982)

2.3.2. Makrofag

Makrofag juga berperan sebagai APC dalam mengolah dan mempresentasikan antigen tumor kepada sel T helper, maupun bertindak langsung sebagai efektor dengan melisis sel tumor (Lands, 1982).

Makrofag yang berperan dalam mekanisme tersebut adalah makrofag aktif yaitu makrofag yang telah diaktifasi oleh *Macrophag Activating Factors* (MAF), suatu sitokin yang dihasilkan limfosit T yang distimulasi antigen. Makrofag yang tidak aktif telah dibuktikan tidak memiliki kemampuan melisis sel tumor (Lands, 1982).

Seperti juga pada sel NK, mekanisme pengenalan sel tumor sasaran oleh makrofag juga belum jelas. Kemampuan untuk berikatan dengan sel tumor terjadi karena sel makrofag juga memiliki reseptor Fc dari IgG, sehingga dapat bekerja sama dengan IgG dalam melisis sel tumor.

Penyebab terjadinya lisis sel tumor disebabkan oleh pengaruh enzim lisosomal, metabolit yang reaktif terhadap oksigen dan NO. Makrofag aktif juga mensekresi sitokin antara lain IL-12 dan Tumor Necrosis Factor (TNF). IL-12 berperan memacu proliferasi dan aktivasi sel T CD4+, sel T CD8+ serta sel NK. TNF, sesuai namanya mampu melisis sel tumor melalui cara : 1) TNF berikatan dengan reseptor permukaan dari sel tumor dan secara langsung melisis sel tumor, 2) TNF dapat menyebabkan nekrosis dari sel tumor dengan cara memobilisasi berbagai respon imun tubuh (NIH Medline, 1995).

Proses pengaktifan makrofag bukanlah proses tunggal. Untuk melihat apakah makrofag teraktivasi maka dilakukan pengukuran tertentu misalnya adalah kemampuan *killing* terhadap sel tumor. Aktivasi makrofag diakibatkan adanya peningkatan transkripsi gen – gen. Adanya peningkatan ekspresi gen-gen tersebut maka makrofag dapat melakukan fungsi yang tidak dapat dilakukan oleh sel yang sama dalam keadaan istirahat. Fungsi tersebut antara lain adalah *killing bacteria* yang sudah difagositosis. Sitokin aktivator makrofag yang poten adalah IFN- γ . IFN- γ bukanlah satu – satunya sitokin yang mengaktifasi makrofag, tetapi makrofag juga diaktifkan oleh kontak dengan limfosit T melalui CD 4. Beberapa ciri yang menunjukkan makrofag teraktivasi diuraikan sebagai berikut (Lands, 1982) :

1. Makrofag teraktivasi akan meningkat kemampuan killing-nya terhadap mikroorganisme.

Killing terhadap bakteri menyangkut proses fagositosis dan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS). Sitokin seperti IFN- γ akan meningkatkan baik endositosis maupun fagositosis oleh monosit. Fagositosis terhadap partikel tertentu dapat ditingkatkan dengan opsonisasi bakteri yaitu dengan melapisi bakteri dengan molekul Ig atau komplemen. IFN- γ menyebabkan ekspresi makrofag dengan ikatan kuat terhadap bagian Fc dari IgG pada makrofag meningkat. Setelah bakteri masuk ke dalam sel maka makrofag akan melakukan pembunuhan dengan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) melalui jalur *reactive oxygen intermediates* (ROI).

2. Makrofag teraktivasi akan memacu inflamasi akut dengan mengeluarkan mediator - mediator inflamasi.

Beberapa mediator seperti *platelet activating factor* (PAF), prostaglandin dan leukotrien adalah lipid. Beberapa disintesis oleh makrofag sendiri dan yang lainnya dihasilkan dari molekul-molekul plasma. sebagai contoh, makrofag dapat menghasilkan *tissue factor* yang dapat menginisiasi *clotting cascade* ekstrinsik.

Trombin sebagai protease darah yang teraktivasi selama *clotting cascade* akan menyebabkan neurofil dan sel endotel mensintesa PAF. Pemberian IFN- γ akan meningkatkan kapasitas biosintesis makrofag untuk membentuk mediator semacam *tissue factor*. Akibat mediator-mediator yang dilepaskan maka terjadilah inflamasi lokal.

3. Makrofag teraktivasi akan meningkat efisiensinya sebagai sel APC.

Peningkatan kapasitas presentasi antigen berhubungan dengan ekspresi molekul MHC kelas II pada permukaannya. IFN- γ diketahui sebagai aktivator untuk transkripsi gen-gen MHC kelas II, tetapi di *makrofag granulocyte- macrophage colony- stimulating factor* (GM-CSF) juga mempunyai efek serupa. Fungsi kostimulator juga meningkat pada makrofag yang teraktivasi. Pada keadaan teraktivasi, makrofag akan mengekspresikan molekul-molekul keluarga B7 dan meningkatkan kadar ICAM-1 dan LFA-3. Pada akhirnya makrofag teraktivasi menghasilkan sitokin seperti IL-12 atau IFN- γ yang memacu diferensiasi limfosit.

Apabila proses inflamasi dan aktivasi makrofag gagal mengeradikasi mikroba maka produk-produk makrofag teraktivasi akan memodifikasi lingkungan jaringan lokal, selanjutnya dimulailah penghancuran jaringan lokal dan digantikan jaringan ikat lain.

4. Makrofag teraktivasi akan membunuh sel – sel tumor

Meskipun makrofag teraktivasi biasanya dihubungkan dengan mekanisme efektor pada pertahanan terhadap organisme infeksius tetapi dari pengamatan didapatkan bukti bahwa makrofag teraktivasi akan membunuh sel-sel ganas. Efek antitumor makrofag ini berhubungan dengan kemampuannya menghasilkan TNF yang menyebabkan kematian sel – sel tumor. Mekanisme antitumor kedua yang terjadi pada mencit adalah kemampuannya menghasilkan NO yang akan membunuh sel – sel tumor.

Apoptosis adalah suatu kematian sel yang terprogram atau *programmed cell death*. Sekali terjadi aktivasi akan menyebabkan reaksi *enzymatic intraseluler*. Enzyme, protein, dan DNA akan terurai, dan tidak ada komponen intraseluler yang terdispersi ke ekstraseluler. Sel mengalami apoptosis akan mengeluarkan signal ke ekstraseluler berupa phospholipid pada membran selnya yang dapat dikenali oleh sel-sel imun, terutama makrofag (Yosief, 2014).

Apoptosis dapat dipicu melalui beberapa stimulus dari luar maupun dalam sel, dapat berupa *signal* ke reseptor membran sel, kerusakan DNA yang menyebabkan defek DNA, kemoterapi, radiasi dan lainnya. Proses apoptosis dapat melalui jalur ekstrinsik dan intrinsik. Jalur ekstrinsik melalui stimulasi reseptor- reseptor kematian tranmembran seperti reseptor Fas yang berlokasi pada membran sel. Untuk jalur intrinsik, inisiasi dimulai dari mitokondria yang melepaskan signal-signal (Madiyono, dkk. 2006).

Jalur Ekstrinsik, molekul penanda dikenal sebagai *ligand*, yang dilepaskan oleh sel yang lain atau dari lingkungan, terikat ke reseptor kematian transmembran sel target Jalur ekstrinsik ada 2 tipe yaitu, I melalui aktifasi *death reseptor* dilanjutkan pembentukan *death-inducing signal complex (DISC)* dan caspase mengambil alih kelanjutannya.³⁷Tipe II, signal yang tidak cukup kuat dari *death receptor* harus diamplifikasi oleh pelepasan enzim mitokondria (sitokrom C) dengan perantara Bcl2 (Moh Nasir, 2009).

Fas Ligand (FasL) akan terikat ke reseptor Fas sel target yang akan memicu berbagai macam reseptor beragregasi di permukaan sel target. Agregasi tersebut merekrut protein adaptor yaitu *Fas-associated death domain protein (FADD)* yang berada pada sitoplasma disekitar reseptor. FADD kemudian menarik caspase-8, suatu protein inisiator, untuk membentuk *DISC*. Caspase-8 yang terlibat dalam DISC akan teraktifasi dan akan mengaktifkan caspase-3, suatu protein efektor yang menginisiasi degradasi sel. Caspase-8 yang aktif juga akan memicu pelepasan sitokrom dari mitokondria setelah mengaktifkan protein BID yang bekerja pada tBID pada membran mitokondria dan di mulailah jalur intrinsik (Joensen, 2010).

Jalur intrinsik dipicu oleh adanya stress seluler, khususnya stress mitokondria yang disebabkan oleh kerusakan DNA dan paparan panas. Dengan menerima signal stress, protein-protein proapoptosis dalam sitoplasma seperti BAX dan BID, mengikatkan diri ke membrane mitokondria untuk memberikan signal internal. Signal oleh BAX dan BID saja tidak cukup untuk menginisiasi, sehingga diperlukan pelepasan sitokrom c dari mitokondria dan muatan intramembran mitokondria. Sitokrom c yang terlepas membentuk kompleks dengan adenosine triphosphat (ATP) dan *apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1)*, suatu enzim, di dalam sitoplasma akan mengaktifkan caspase-9, suatu protein inisiator. Caspase-9 aktif bersama dengan sitokrom c, ATP dan Apaf-1 membentuk kompleks apoptosom, kompleks tersebut disebut sebagai kompleks protein *cytosolic death signaling*, (Mantovani, 2004) yang akan mengaktifkan caspase-3, -6, and - 7, protein efektor degradasi (Bruera, dkk. 2003). Selain sitokrom c, muatan intra membran melepaskan pula *apoptosis inducing factor (AIF)*, yang memfasilitasi fragmentasi DNA dan Smac/protein Diablo yang menghambat faktor penghambat apoptosis (Kimura, dkk. 2005).

2.4. Tempe

Komposisi gizi tempe baik kadar protein, lemak, dan karbohidratnya tidak banyak berubah dibandingkan dengan kedelai. Karena adanya enzim pencernaan yang dihasilkan oleh kapang tempe, maka protein, lemak, dan karbohidrat pada tempe menjadi lebih mudah dicerna di dalam tubuh dibandingkan yang terdapat dalam kedelai.

Di dalam tempe juga ditemukan suatu zat antioksidan dalam bentuk isoflavon. Seperti halnya vitamin C, E, dan karotenoid, isoflavon juga merupakan antioksidan yang sangat dibutuhkan tubuh untuk menghentikan reaksi pembentukan radikal bebas. Tempe dapat berperan dalam sistem pertahanan tubuh yang berguna untuk menangkal kerusakan sel tubuh yang disebabkan oleh radikal bebas dari konsumsi makanan yang dapat menimbulkan kanker. Pada tempe di samping ketiga jenis isoflavon yang terdapat pada kedelai yaitu daidzein, glisitein, dan genistein juga terdapat

antioksidan faktor II (6,7,4-trihidroksi isoflavon) yang mempunyai sifat antioksidan paling kuat dibandingkan dengan isoflavon dalam kedelai. Antioksidan ini disintesis pada saat terjadinya proses fermentasi kedelai menjadi tempe oleh bakteri *Micrococcus luteus* dan *Coreyne bacterium*. Kedelai yang di buat tempe mempunyai kandungan genestein, suatu antioksidan flavonoid paling tinggi di banding produk olahan lainnya seperti tahu. Antioksidan flavonoid berfungsi sebagai anti tumor atau anti kanker (Atun, 2009).

Para ahli berupaya untuk meningkatkan kandungan isoflavon dari kedelai melalui teknik fermentasi. Penelitian yang dilakukan oleh Ralston (2005) menunjukkan bahwa enzim-enzim yang dihasilkan oleh bakteri *Rhizopus oligosporus* yang terdapat dalam ragi tempe dapat mengubah senyawa flavanon menjadi isoflavon selama proses fermentasi. Proses fermentasi juga dapat menghidrolisis senyawa-senyawa flavon glikosida menjadi aglikonnya, yang menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi. (Atun, 2009).

Selain sebagai sumber antioksidan yang mengandung isoflavon aglikon sebagai pencegah kanker, tempe juga dapat menjadi salah satu sumber antibiotik, zat anti bakteri yang memperkecil peluang infeksi. Penelitian yang dilakukan di Universitas North Carolina, Amerika Serikat, menemukan bahwa genistein dan fitoestrogen yang terdapat pada tempe ternyata dapat mencegah kanker prostat dan payudara.

Hasil penelitian Afandy dan Suhartono (2007) dalam proses kromatografi menunjukkan kandungan isoflavon jenis daidzein sebesar 0.129 mg/ml atau setara dengan 28.67 mg/100 g berat kering pada sampel kedelai dan 0.221 mg/ml atau setara dengan 49.11 mg/100 g berat kering pada sampel tempe. Potensi antioksidan yang dimiliki isoflavon kedelai dan tempe diuji dengan menggunakan metode kandungan total fenol dan aktivitas antioksidan. Kandungan total fenol yang ada dalam ekstrak isoflavon kedelai adalah sebesar 61.01 ppm atau setara dengan 13.56 mg/100 g berat kering, sedangkan pada ekstrak isoflavon tempe terdapat kandungan total fenol sebesar 69.23 ppm atau setara dengan 15.39 mg/100 g berat kering. Pengujian

aktivitas antioksidan pada kedua jenis isoflavon menghasilkan aktivitas antioksidan sebesar 61.32% pada isoflavon kedelai dan 66.92% pada isoflavon tempe. Sehingga kandungan isoflavon dan aktifitas antioksidan lebih besar terdapat dalam tempe dibandingkan pada kedelai.

2.4.1. Kandungan Tempe

Tabel 2.3 Komposisi Gizi Tempe per 100 gram

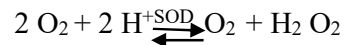
Kandungan Gizi Tempe per 100 gram tempe:

Air	55,3	g
Energi	201	kalori
Protein	20,8	g
Lemak	8,8	g
Lemak jenuh (Saturated fatty acids)	1,11	g
Lemak tidak jenuh (Poly-unsaturated fatty acids)	4,3	g
Karbohidrat	17,00	g
Serat (Fiber)	4,80	g
Abu	1,40	g
Isoflavon	53,00	mg
Kalsium (Ca)	93,00	mg
Besi (Fe)	2,30	mg
Magnesium (Mg)	70,00	mg
Phosphorus (P)	206,00	mg
Potassium (K)	367,00	mg
Sodium (Na)	6,00	mg
Zinc (Zn)	1,81	mg
Copper (Cu)	0,67	mg
Manganese (Mn)	1,43	mg
Selenium (Se)	8,80	µg
Vitamin C	0,00	mg
Vitamin B1 (Thiamine)	0,131	mg
Vitamin B2 (Riboflavin)	0,111	mg
Vitamin B3 (Niacin)	4,630	mg
Vitamin B5 (Panthothenic acid)	0,355	mg
Vitamin B6	0,299	mg
Vitamin B12	1,00	µg
Vitamin A	69,00	µg
Folic Acid	52,00	µg

Sumber : Afandy dan Suhartono (2007) dan buku bunga rampai tempe Indonesia

Selama proses fermentasi tempe terbentuk senyawa antioksidan faktor II (6,7,4' trihidroksi isoflavon) (Georgry, 1964). Tikus yang diberi tempe menunjukkan prosentase penghambatan oleh enzim superoksida

dismutase yang paling tinggi sebesar 26,99% dibandingkan dengan kedelai (21,21%) dan kasein (20,07%) Sebagaimana diketahui enzim superoksida dismutase mempunyai substrat yang spesifik yaitu ion superoksida



Apabila enzim superoksida dismutase kurang aktif maka radikal bebas superoksida akan membentuk radikal peroksil yang bersifat reaktif dan selanjutnya akan terjadi kerusakan asam lemak tidak jenuh dengan menghasilkan senyawa aldehid yang beracun (Astuti, 1996).

Tempe mengandung alfa dan gama tokoferol dalam konsentrasi cukup tinggi selain mineral mikro dan antioksidan. Menurut Jung (1991) alfa dan gama tokoferol merupakan antioksidan yang potensial untuk mencegah oksidasi lemak yang terjadi dalam minyak kedelai. Alfa tokoferol merupakan antioksidan pemutus rantai yang bersifat lipofilik dan dapat bereaksi dengan radikal peroksida lemak sehingga terjadi hambatan oksidasi asam lemak tidak jenuh terutama asam arakhidonat.

Dalam penelitian Astuti (1996) aktivitas enzim superoksida dismutase terdapat dalam tempe sedangkan tidak ditemukan dalam kedelai. Sehingga memberi harapan dalam mencegah penyakit degenerative salah satunya kanker yang berkaitan dengan proses oksidasi dan menghasilkan radikal bebas. Diantara beberapa jenis kacang-kacangan, kedelai merupakan sumber protein, vitamin, lemak, serat dan mineral yang paling baik. Terkandung beberapa fosfolipida pada lemak kacang kedelai yang penting yaitu lesitin, sepalin dan lipositol. Kedelai sendiri secara umum telah diyakini sebagai pencegah atau penyembuh penyakit seperti contoh diabetes, anemia, rematik, diare, hipertensi dan hepatitis.

Isoflavon termasuk dalam kelompok senyawa flavonoid yang banyak dijumpai pada buah-buahan, sayur-sayuran dan biji-bijian. Kedelai merupakan urutan pertama dengan kandungan senyawa isoflavon dan derivatnya. Isoflavon dan derivatnya merupakan senyawa dengan fungsi sebagai antioksidan, anti tumor, antiosteoklerosis (Dixon RA, Steele CL, 1999 : Yuan D, 2008). Kandungan isoflavon pada kedelai antara 2 – 4 mg/g kedelai. Secara umum isoflavon merupakan senyawa kompleks. Selama

proses pengolahan baik secara fermentasi maupun non-fermentasi, senyawa isoflavon dapat mengalami perubahan, terutama pada saat proses hidrolisa sehingga dapat diperoleh senyawa isoflavon bebas yang disebut aglikon yaitu genistein, glisitein dan deidzein.

Dari hasil penelitian telah ditunjukkan bahwa kedelai yang difermentasi oleh jamur *Rhizopus oligosporus*, seperti tempe memberikan kandungan isoflavon dan derivatnya yang lebih tinggi dari pada dalam biji kedelai (Ralston L, 2005). Reaksi metabolisme jamur *Rhizopus oligosporus* secara anaerob telah mengubah senyawa flavonoid menjadi isoflavonoid.

2.4.2. Tempe Meningkatkan Sistem Imun

Ada tiga kemungkinan komponen tempe mampu meningkatkan sistem imun di dalam tubuh, pada makrofag khususnya (Nurrahman, 2015). Makrofag adalah sel fagosit mononuclear yang utama dalam jaringan yang berperan dalam proses fagositosis mikroorganisme atau molekul kompleks asing (Paul, 2005).

Pertama, komponen tempe diantaranya vitamin E, β -karoten, asam folat, piridoksin, riboflavin dan vitamin B12 (Maggini, 2007) dan beberapa asam amino seperti lisin, metionin, tryptofan, treonin dan leusin (Karmini, 1996 dan Nurrahman, 2012) meningkatkan kinerja sel imun. Peningkatan respon imun tersebut ditentukan secara genetik dan dipengaruhi lingkungan terutama makanan yang mengandung gizi tertentu. Protein yang utama dari lima jenis asam amino esensial yaitu lysine, methionin, tryptophan, threonine dan leusin merupakan asam amino penting untuk produksi makrofag, kecuali methionin (asam amino pembatas) yang mana tempe dalam bentuk bebas. Vitamin A, asam panthotenat, piridoksin, riboflavin, vitamin B12 dan asam folat mempengaruhi pembentukan dan kualitas antibodi selain asam amino (Karmani, 1996). Komponen tersebut terdapat dalam jumlah besar dalam tempe kecuali vitamin A yang tidak terkandung dalam tempe (Nurrahman, 2015).

Kedua, komponen Zn, Cu dan Fe dalam tempe dapat meningkatkan aktivitas enzim antioksidan, sehingga kemampuan menghambat reaksi

oksidasi juga meningkat dan *performance* sel tubuh diantaranya makrofag meningkat (Ramprasath, 2005 dan Rimbach, 2008).

Dilaporkan dalam penelitian Nurrahman (2012) bahwa tikus yang mengkonsumsi tempe kedelai hitam menunjukkan adanya peningkatan aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) dan daya tahan limfosit terhadap hydrogen peroksida. Pada orang yang mengkonsumsi tempe kedelai hitam selama satu bulan meningkatkan daya tahan limfosit terhadap hydrogen peroksida (Nurrahman, 2003). Sehingga dimungkinkan keadaan yang sama dari kedua penelitian Nurrahman tersebut bahwa tempe kedelai juga mempunyai manfaat yang tidak jauh berbeda dari tempe kedelai hitam.

Ketiga, komponen fitokimia pada tempe berinteraksi dengan reseptor pada permukaan sel imun yang kemudian meningkatkan aktivitas enzim protein tirosin kinase (PTK) dan DNA *polymerase*. Peningkatan aktivitas kedua enzim ini mendorong sel imun untuk berproliferasi lebih tinggi (Tejasari, 2007). Genestein adalah salah satu isoflavon yang terdapat di kedelai dan produk dari kedelai yang mampu berikatan dengan reseptor ekstrogen menurut Dixon (2002). Zhao (2005) menyatakan pula isoflavon menunjukkan efek estrogenesis yang dapat berikatan dengan reseptor ekstrogen dan menginduksi produk spesifik (limfokin) dari gen yang merespon estrogen.

2.4.3. Pengaruh Isoflavon terhadap Kanker Payudara

Kanker merupakan salah satu jenis dari penyakit degeneratif. Secara umum penyakit degeneratif merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh kerusakan sel, jaringan lemak dan protein, imunitas dan DNA dengan faktor alami maupun zat-zat kimia bersifat karsinogenik. Reaksi radikal bebas merupakan salah satu teori penyebab terjadinya kanker yang dianggap cukup signifikan, karena terjadi radikal hidroksil dalam mekanisme biokimia yang terjadi di dalam tubuh.

Senyawa yang dianggap berpotensi sebagai antikanker adalah senyawa flavonoida dan isoflavonoida. Dari banyaknya senyawa flavonoida dan isoflavonoida yang disebut sebagai antikanker adalah genestein yang

berupa isoflavon aglikon. Potensi tersebut menghambat perkembangan sel kanker payudara (Lamistiere dkk, 1997).

Penghambatan sel kanker oleh senyawa flavonoida dan isoflavonoida terjadi pada saat fase promosi (Fujiki dkk, 1986). Salah satu komponen isoflavon yang berupa genestein juga terdapat pada kedelai dan tempe kedelai.

Peterson dkk, (1997) telah menjelaskan penghambatan sel kanker oleh genestein dengan mekanisme berikut :

1. Penghambatan proliferasi sel (sel normal, sel yang terinduksi faktor pertumbuhan sitokinin, dan sel kanker payudara yang terinduksi nonil-fenol atau bi-fenol A) yang diakibatkan oleh penghambatan pada pembentukan membran sel terutama penghambatan pembentukan protein dengan kandungan tirosin.
2. Penghambatan pada aktivitas enzim DNA isomerase II.
3. Penghambatan pada proses regulasi siklus sel.
4. Sifat antioksidan dan anti-angiogenik yang disebabkan oleh sifat reaktif terhadap senyawa radikal bebas.
5. Sifat mutagenik pada gen endoglin (gen transforman pada faktor pertumbuhan beta atau TGF β). Mekanisme ini dapat berlangsung jika genestein $> 5 \mu\text{M}$

2.5. Tikus *sprague dawley* betina yang diinduksi DMBA

Kebutuhan pada sample adalah tikus *sprague dawley* betina dengan kanker payudara maka dilakukan rekayasa pembentukan kanker payudara pada tikus *sprague dawley* betina yang sehat. Pada penelitian ini model kanker payudara dibuat dengan menggunakan induksi senyawa 7,12 – dimetilbenz(α)antrasena (DMBA) dengan pertimbangan bahwa senyawa tersebut merupakan golongan polisiklik aromatik hidrokarbon yang paling berpotensi pada pembentukan dan perkembangan sel kanker.

Peradangan yang terjadi adalah periartrosis yang memiliki kemungkinan sebagai awal pembentukan kanker payudara pada tikus *sprague dawley* betina akibat induksi dari DMBA. DMBA merupakan suatu zat karsinogenik yang dibioaktivasi oleh enzim sitokrom P450 untuk menjadi

senyawa epoksid yang bersifat reaktif untuk dapat berikatan dengan DNA. Senyawa reaktif tersebut dapat menyebabkan stres oksidatif sehingga terjadi peroksidasi pada membran lipid dan terjadinya kerusakan pada sel.

Terjadinya suatu peradangan disebabkan oleh enzim siklooksigenase (COX). Enzim COX terdiri atas 2 isoenzim yaitu COX -1 dan COX -2. Enzim COX -1 bersifat konstitutif untuk memelihara fisiologi normal dan homeostatis, sedangkan COX -2 merupakan enzim yang terinduksi pada sel dengan inflamasi. COX -2 juga berperan dalam proliferasi sel kanker. Kebanyakan overekspresi COX -2 ditemukan pada kanker.

2.6. Penentuan Dosis Tepung Tempe

Penentuan dosis berdasarkan pada penelitian sejenis yang pernah dilakukan oleh Siti Harnina Bintari (2007). Dosis yang telah ditentukan adalah 0% tempe dalam 20 gram pakan pada perlakuan pertama, 1% tempe kedelai dalam 20 gram pakan pada perlakuan kedua, 10% tempe kedelai dalam 20 gram pakan pada perlakuan ketiga, 50% tempe kedelai dalam 20 gram pakan pada perlakuan keempat dan 75% tempe kedelai dalam 20 gram pakan pada perlakuan kelima.

Pemberian pakan merupakan modifikasi dari AIN 93 yang beberapa kandungannya telah disubstitusi oleh tempe kedelai yang telah ditepungkan.

Dosis I	0%	x	20.000 mg	=	0 mg
Dosis II	1%	x	20.000 mg	=	200 mg
Dosis III	10%	x	20.000 mg	=	2.000 mg
Dosis IV	50%	x	20.000 mg	=	10.000 mg
Dosis V	75%	x	20.000 mg	=	15.000 mg

Dengan menggunakan angka konversi 387.9 dari tabel konversi milik Laurence (2008) maka ditemukan dosis untuk manusia sebagai berikut :

Dosis I	387.9	x	0 g	=	0 g
Dosis II	387.9	x	0.2 g	=	77.58 g
Dosis III	387.9	x	2 g	=	775.8 g
Dosis IV	387.9	x	10 g	=	3879 g
Dosis V	387.9	x	15 g	=	5818.5 g

2.7. Kerangka Teori

Kanker merupakan suatu penyakit neoplasma yang ditandai dengan adanya kelainan siklus sel yang menyebabkan sel tumbuh tidak terkendali, bermigrasi ke jaringan tubuh melalui sistem limfatik dan menyerang jaringan biologis yang terdekat. Kanker payudara merupakan suatu tumor ganas yang menyerang jaringan payudara. Jaringan tersebut terdiri atas kelenjar susu, saluran kelenjar dan jaringan penunjang payudara, namun tidak menyerang kulit payudara.

Kanker payudara menyebabkan sel dan jaringan pada payudara menjadi abnormal dan bertambah secara tidak terkendali. Anemia adalah suatu kondisi dimana tubuh yang ditandai dengan terjadinya defisiensi pada ukuran dan jumlah eritrosit, pada kadar hemoglobin yang tidak mencukupi untuk fungsi pertukaran O₂ dan CO₂ yang terjadi diantara jaringan dan darah.

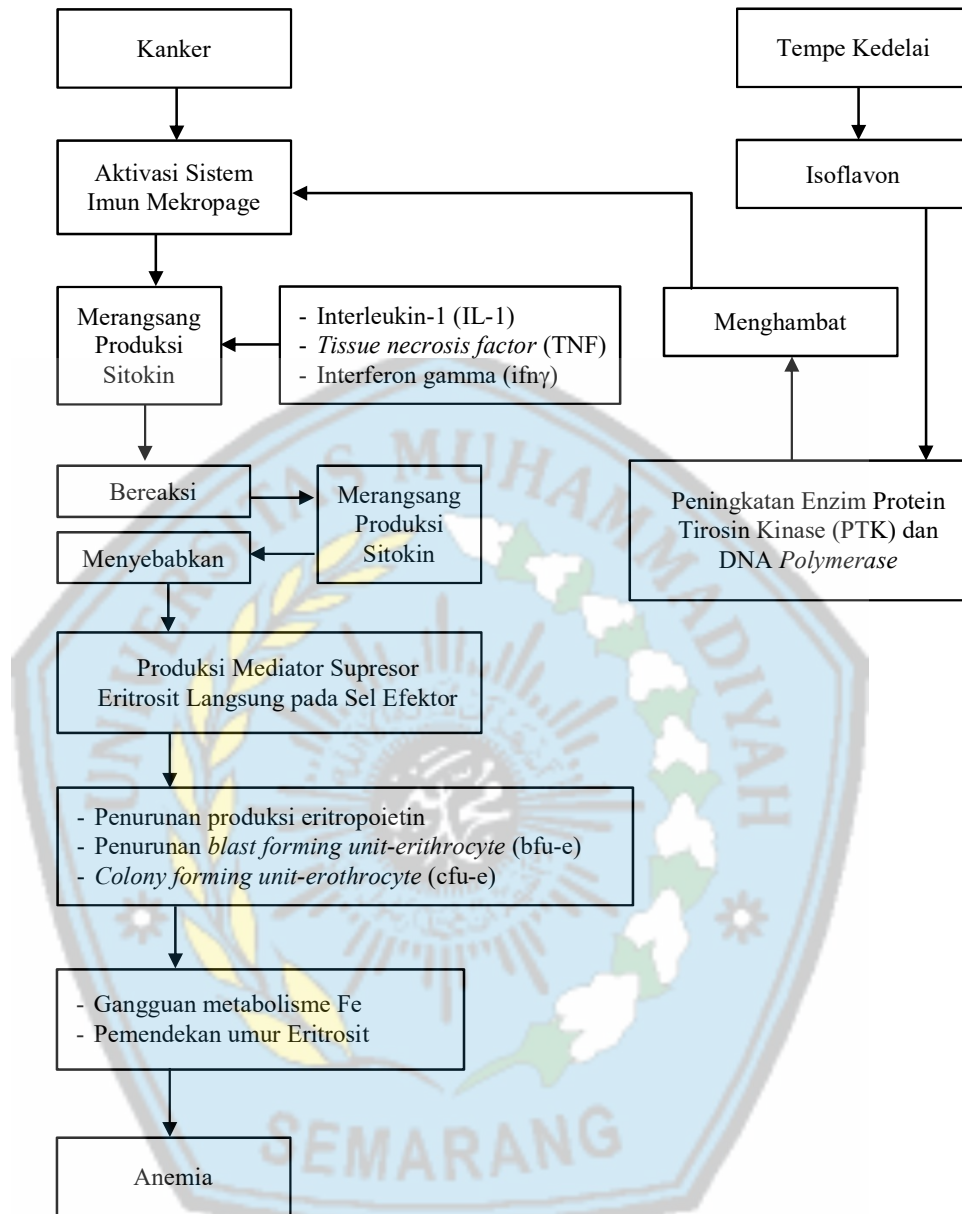
Anemia adalah suatu defisiensi dari kadar hemoglobin darah ataupun jumlah maupun volume sel darah merah. Anemia sering dijumpai pada penderita kanker (Henry, 1998). Terjadinya anemia pada kanker dapat langsung disebabkan oleh efek langsung dari tumor, efek dari hasil produk tumor dan efek dari pengobatan tumor itu sendiri. Insiden anemia pada penderita kanker bervariasi, tergantung pada jenis tumor dan jenis terapi yang diberikan (Muthalib dkk, 2001). Insiden anemia pada penderita kanker sebesar 50% dan meningkat menjadi di atas 90% pada kanker stadium lanjut atau kanker yang diobati dengan kemoterapi atau radioterapi (Henry, 1998). Peneliti lain mendapatkan insiden anemia sebesar 78% pada leukemia, 62% pada mieloma multipel dan 42-72% pada limfoma.

Terjadinya anemia pada kanker dimulai dengan diaktivasinya sistem imun tubuh mekropage oleh tumor, kemudian mekropage merangsang produksi sitokin berupa peningkatan interleukin-1 (IL-1) *tissue necrosis factor* (TNF) dan interferon gamma (IFN γ), selanjutnya sitokin akan bereaksi dengan limfosit, sel endotel dan fibroblas, akibatnya akan diproduksi mediator supresor eritrosit langsung pada sel efektor.

Selanjutnya akan menyebabkan terjadinya penurunan produksi eritropoietin, penurunan *blast forming unit-erithrocyte* (BFU-E) dan *colony forming unit-erithrocyte* (CFU-E). Gangguan metabolisme Fe dan terjadinya pemendekan umur eritrosit. Akhirnya akan terjadi anemia (Muthalib dkk, 2001).

Komposisi gizi tempe baik kadar protein, lemak, dan karbohidratnya tidak banyak berubah dibandingkan dengan kedelai. Karena adanya enzim pencernaan yang dihasilkan oleh kapang tempe, maka protein, lemak, dan karbohidrat pada tempe menjadi lebih mudah dicerna di dalam tubuh dibandingkan yang terdapat dalam kedelai.

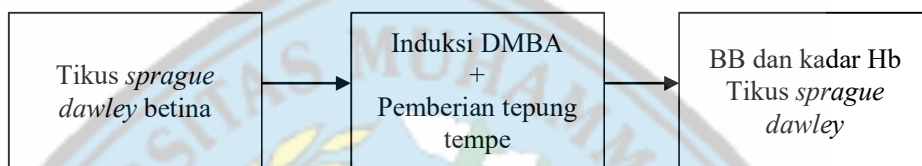
Di dalam tempe juga ditemukan suatu zat antioksidan dalam bentuk isoflavon. Seperti halnya vitamin C, E, dan karotenoid, isoflavon juga merupakan antioksidan yang sangat dibutuhkan tubuh untuk menghentikan reaksi pembentukan radikal bebas. Tempe dapat berperan dalam sistem pertahanan tubuh yang berguna untuk menangkal kerusakan sel tubuh yang disebabkan oleh radikal bebas dari konsumsi makanan yang dapat menimbulkan kanker. Pada tempe di samping ketiga jenis isoflavon yang terdapat pada kedelai yaitu daidzein, glisitein, dan genistein juga terdapat antioksidan faktor II (6,7,4-trihidroksi isoflavon) yang mempunyai sifat antioksidan paling kuat dibandingkan dengan isoflavon dalam kedelai. Antioksidan ini disintesis pada saat terjadinya proses fermentasi kedelai menjadi tempe oleh bakteri *Micrococcus luteus* dan *Coreyne bacterium*. Kedelai yang di buat tempe mempunyai kandungan genestein, suatu anti oksidan flavonoid paling tinggi di banding produk olahan lainnya seperti tahu. Antioksidan flavonoid berfungsi sebagai anti tumor atau anti kanker (Atun, 2009).



Gambar 2.7 Kerangka Teori

2.8. Kerangka Konsep

Pada penelitian ini kerangka konsep disusun berdasarkan uraian yang terdapat pada kerangka teori, yaitu penelitian mengamati beberapa variabel yang terdiri atas variabel bebas dan variabel terikat. Pada penelitian ini memiliki variabel bebas berupa variasi dosis tepung tempe dan variabel terikat kadar hemoglobin pada tikus *sprague dawley* betina. Dosis yang telah ditetapkan adalah 0%, 1%, 10%, 50% dan 70% tepung tempe dari total pakan yang dikonsumsi per hari.



Gambar 2.8 Kerangka Konsep

2.9. Hipotesis

Tepung tempe sebagai bahan campuran pada campuran pakan AIN 93 dengan dosis 0%, 1%, 10%, 50% dan 75% berpengaruh terhadap kadar hemoglobin pada tikus *sprague dawley* betina dengan kanker payudara yang diinduksi DMBA (*Dimethylbenz (α) Antrasen*).