

BAB 6

PEMBAHASAN

Phaleria macrocarpa merupakan salah satu tanaman obat tradisional Indonesia yang mempunyai efek anti kanker, namun masih belum memiliki acuan ilmiah yang cukup lengkap baik dari segi farmakologi maupun fitokimia. Pemanfaatan *Phaleria macrocarpa* ini antara lain adalah sebagai tanaman obat anti kanker atau sitostatika dan anti mikroba. Bukti ó bukti empiris tentang khasiatnya sudah banyak ditemukan di kalangan masyarakat, namun pembuktian ilmiahnya masih sangat terbatas, sehingga masih memerlukan suatu pembuktian.^{11,12} Sebagai salah satu usaha membuktikan efek *phaleria macrocarpa* sebagai obat anti kanker khususnya pada karsinoma epidermoid maka dilakukan penelitian ini yang bertujuan untuk membuktikan efek *phaleria macrocarpa* dengan indikator ekspresi caspase 3 dan indeks apoptosis sel karsinoma epidermoid pada mencit Swiss.

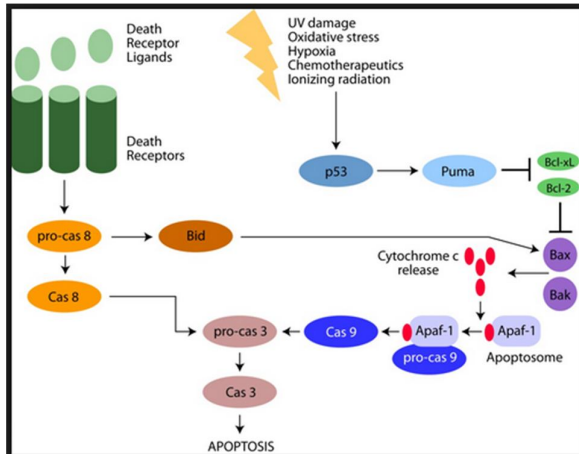
Pada penelitian ini didapatkan peningkatan ekspresi caspase 3 pada semua kelompok perlakuan yang diberi ekstrak *phaleria macrocarpa*, kemoterapi *paclitaxel-cisplatin*, dan kombinasi keduanya dibanding kelompok kontrol. Peningkatan ekspresi caspase 3 sesuai urutan dari besar ke kecil terlihat pada kelompok yang diberi kombinasi ekstrak *phaleria macrocarpa* dan kemoterapi *paclitaxel-cisplatin* (kelompok P3), diberi kemoterapi *paclitaxel-Cisplatin* (kelompok P2) dan pada kelompok yang diberi ekstrak *phaleria macrocarpa* (P1). Hasil yang bermakna ($p < 0,05$) terjadi pada semua kelompok perlakuan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol (K).

Hasil yang bermakna pada kelompok perlakuan yang diberi ekstrak *phaleria macrocarpa* berkaitan dengan *polyphenol* yang terkandung dalam tanaman obat dilaporkan mempunyai efek menginduksi untuk terjadinya apoptosis melalui jalur TNF- (jalur ekstrinsik / *extrinsic pathway*).^{10,26} Zat aktif *pholyphenol* yang terkandung dalam *phaleria*

macrocarpa seperti *gallic acid* dan *flavanoid* berperan dalam menginduksi apoptosis, dimana pada penelitian dengan menggunakan sel kanker esofagus (TE-1) terlihat bahwa *gallic acid* (*GA* : *3,4,5-trihydroxybenzoic acid*) akan meningkatkan protein pro apoptosis Bax dan akan menurunkan protein anti apoptosis Bcl-2.²⁷ Sementara itu, *flavanoid* bekerja dengan cara penghambatan aktivitas DNA topoisomerase I/II, modulasi *signalling pathways*, penurunan ekspresi gen Bcl-2 dan Bcl-XL (anti apoptosis), peningkatan ekspresi gen Bax dan Bak (pro apoptosis), serta aktivasi endonuklease.⁴² Topoisomerase merupakan suatu enzim yang berfungsi memotong DNA yang berilitan ketat akibat pembukaan *double strand* DNA oleh enzim helikase, memutar balik dan kemudian menyambungkan lagi. Enzim tersebut bekerja pada saat perpanjangan replikasi DNA. Jika terjadi penghambatan terhadap aktivitas topoisomerase, akan terjadi stabilisasi kompleks topoisomerase-DNA terpotong, sehingga menghasilkan kerusakan *double strand* DNA permanen yang akan mengaktifasi p53.^{43,44} Aktifasi p53 sebagai respon dari kerusakan DNA akan menghentikan siklus mitosis pada fase G1, sehingga sel tidak bisa memasuki fase S jika kerusakan DNA tersebut belum diperbaiki dan apabila kerusakan DNA tersebut tidak bisa diperbaiki, maka p53 akan mengaktifasi protein pro apoptotic *Bcl-2 Family* seperti Bid, Bax dan Bak yang selanjutnya akan menyebabkan penagaktifan caspase 3 yang pada akhirnya menyebabkan apoptosis sel.^{45,46,47}

Bax, Bak, Bcl2 dan Bcl-xl adalah *family* protein Bcl-2. Bax dan Bak merupakan protein proapoptosis sedangkan Bcl-2 dan Bcl-xl merupakan protein antiapoptosis. Bcl2 menempel pada membran luar mitokondria sehingga menghalangi pelepasan sitokrom c sedangkan Bcl-xl berikatan dengan Apaf-1. Sitokrom c dan Apaf-1 diperlukan dalam proses apoptosis melalui jalur intrinsik dengan cara mengaktifasi caspase 9. Fungsi bertahan hidup tersebut diimbangi oleh fungsi kematian sel yang diperantarai oleh Bax dan Bak. Bax dapat berikatan dengan membran luar mitokondria sehingga menginduksi pengeluaran sitokrom c dari mitokondria sedangkan Bak dapat berikatan dengan Bcl-xl sehingga membebaskan Apaf-1.

Apabila ekspresi Bax atau Bak dinaikkan dan Bcl-2 atau Bcl-xl diturunkan, maka akan terjadi regulasi sel ke arah kematian sel melalui aktivasi caspase 9 yang selanjutnya akan menyebabkan penagaktifan caspase 3 yang pada akhirnya menyebabkan apoptosis sel.^{26,27,46,47}



Gambar 9. The extrinsic and intrinsic pathways of apoptotic⁴⁸

Pemberian ekstrak *phaleria macrocarpa*, kemoterapi *paclitaxel-cisplatin*, dan kombinasi keduanya juga terbukti meningkatkan indeks apoptosis jika dibandingkan dengan kontrol. Peningkatan indeks apoptosis sesuai urutan dari besar ke kecil terlihat pada kelompok yang diberi kombinasi ekstrak *phaleria macrocarpa* dan kemoterapi *paclitaxel-cisplatin* (kelompok P3), diberi kemoterapi *paclitaxel-cisplatin* (kelompok P2) dan pada kelompok yang diberi ekstrak *Phaleria macrocarpa* (P1). Hasil yang bermakna ($p < 0,05$) terjadi pada semua kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

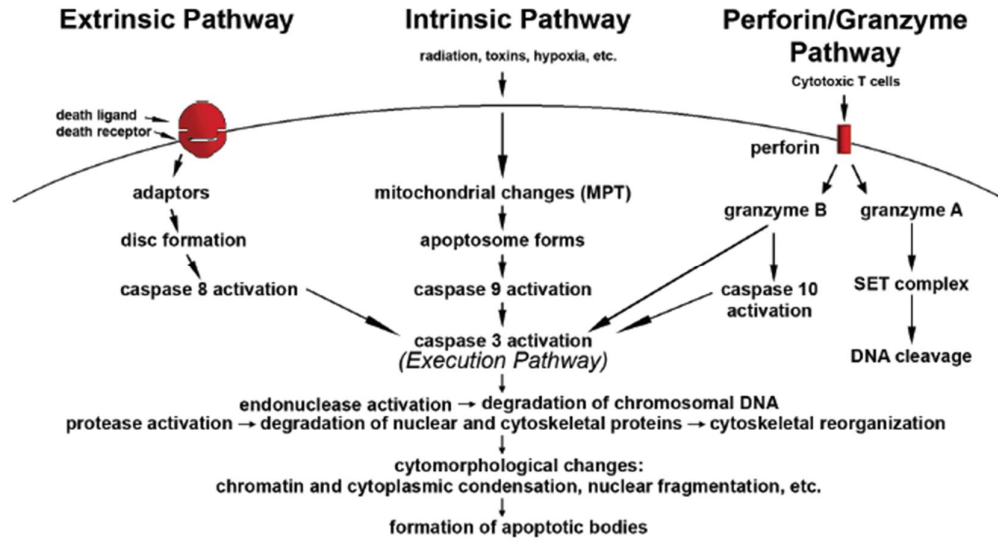
Peningkatan indeks apoptosis pada kelompok perlakuan selain disebabkan karena *gallic acid* dan *flavanoid* meningkatkan ekspresi caspase 3 seperti uraian diatas, juga karena *gallic acid* dan *flavanoid* dapat menstimulasi produksi interferon- (IFN-) dalam suatu populasi immunosit, yang sangat penting dalam memacu aktivasi CTL dan sel NK pada sistem perondaan imun terhadap sel-sel kanker. Bila CTL dan sel NK ini aktif maka akan banyak terjadi proses *killing* terhadap sel-sel tumor yang menyebabkan banyak terjadi apoptosis sel-sel tumor.^{10,47} Disamping itu efektor sel NK membunuh sel kanker dengan mengeluarkan

perforin dan *granzyme* yang kemudian menginduksi apoptosis sel target; mengeluarkan IFN- γ yang meningkatkan kerja fagositosis makrofag; melakukan ikatan pada *target-cell death receptor*, seperti FAS (CD95) ataupun FAS Ligan (FasL) pada sel kanker yang telah diopsonisasi sehingga sel kanker diprogram apoptosis; serta memecahkan/hidrolisis substrat protein spesifik termasuk caspase menyebabkan sel-sel target akan mengalami apoptosis.^{10,26,27}

Paclitaxel sendiri selain menghambat proliferasi sel juga dapat meningkatkan apoptosis dengan cara menurunkan ekspresi Bcl-2 dan Bcl-xl, serta menaikkan protein proapoptosis Bax.^{27,44} Sementara itu, *cisplatin* selain berkerja dengan cara menghambat siklus sel juga dapat meningkatkan apoptosis dengan cara menginduksi P53, P53 ini akan menginduksi protein proapoptosis Bax sehingga pada akhirnya akan menyebabkan apoptosis sel. Oleh karena itu didapatkan efek sinergi antara pemberian ekstrak *phaleria macrocarpa* dan kemoterapi *paclitaxel-cisplatin*.^{27,44,49,50}

Sementara dari hasil uji korelasi yang dilakukan untuk menganalisis hubungan antara ekspresi caspase 3 dengan indeks apoptosis menggunakan uji *Spearman* didapatkan hubungan yang bermakna dengan nilai $p = <0,001$ ($p < 0,05$) dan nilai $r = 0,961$, sehingga dapat disimpulkan terdapat korelasi yang bermakna antara ekspresi caspase 3 terhadap indeks apoptosis dengan hubungan positif sangat kuat. Hal ini sesuai dengan tiga mekanisme terjadinya apoptosis yaitu melalui :

1. Jalur ekstrinsik (*extrinsic pathway*) dimana terjadi aktivasi *death reseptor* (DR) yang ada di permukaan membrane sel oleh ligan yang selanjutnya akan mengaktifasi caspase 8 dan pada akhirnya menyebabkan caspase 3 teraktifasi.
2. Jalur intrinsik (*intrinsi pathway*) dimana terjadi *cellular stress* (stress oksidasi, radiasi, obat-obat cytotoxic) yang akan menyebabkan mitokondria mensintesi *cytocrom c* yang akan berikatan dengan Apaf-1 dan pro caspase 9 membentuk *apoptosome* yang akan menyebabkan caspase 9 teraktifasi dan pada akhirnya menyebabkan caspase 3 teraktifasi. Jalur intrinsic juga dapat diaktifasi oleh caspase 8 (*extrinsic pathway*) melalui pemecahan protein Bid.
3. Jalur *Granzyme B pathway* yang sensitive terhadap target sel.^{26,46,51}



Gambar 10. *The pathways of apoptosis*⁵¹