

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Kanker usus besar merupakan penyakit dengan patogenesis yang kompleks dan multifaktorial. Walaupun penyebab kanker kolon belum diketahui secara pasti, namun serangkaian studi berbasis populasi menunjukkan bahwa pasien dengan kolitis memiliki resiko lebih tinggi terkena kanker kolon. Terdapat beberapa pilihan terapi yang dapat dipertimbangkan termasuk pembedahan, kemoterapi, atau radioterapi, yang penentuannya berdasarkan derajat keparahan, metastasis, dan kondisi fisik pasien. Beberapa keterbatasan deteksi maupun terapi yang ada menimbulkan urgensi mencari pilihan terapeutik lain. Salah satu herbal yang diduga mempunyai aktivitas anti-kanker adalah daun benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*).

Pada proses inflamasi kronis, yang pada penelitian ini digunakan sebagai induksi kanker kolon, terjadi kerusakan direkt DNA, inhibisi apoptosis, malfungsi sistem imun, maupun stimulasi angiogenesis. Inflamasi kronis pada saluran cerna juga diketahui dapat menstimulasi proliferasi sel yang lebih rentan mengalami mutasi (Macathur, 2004). Marker inflamasi kronis ialah infiltrasi leukosit (Pene, 2008). Leukosit dapat mengalami migrasi ke jaringan tersebut karena adanya sekresi sitokin oleh sel neoplastik menghasilkan lingkungan tumor proinflamasi namun mensupresi respon imun dalam melawan tumor (Coussens, 2002). Salah satu prinsip dasar dalam penelitian imunitas kanker adalah bahwa infiltrasi leukosit, terutama limfosit, bertujuan untuk mengenali dan menarget sel yang telah mengalami transformasi. Infiltrasi ini mempercepat eliminasi tumor sebelum menghasilkan manifestasi klinis yang

bermakna (Flavell, 2010). Akibat sekresi IL-10 oleh sel neoplasma, limfosit akan terakumulasi di jaringan. Keberadaan limfosit meningkatkan konsentrasi protein inflamasi (*C-reactive protein*) di jaringan. Kondisi ini mendukung progresifitas tumor dan menurunkan *survival rate* pasien dengan kanker kolon. (Canna, 2005)

### 6.1 Efek pemberian AOM dan DSS terhadap infiltrasi sel limfosit

Dari hasil penelitian Tabel 5.1, didapatkan peningkatan rata-rata jumlah sel limfosit yang mengalami infiltrasi ke jaringan pada kontrol positif (mencit yang diinduksi Azoxymetana (AOM) dan Dextran Sodium Sulfat (DSS)) sebesar 429,25 sel, dibandingkan kontrol negatif (mencit yang tidak diberi perlakuan) 5,75 sel. Dari analisis post-hoc Tabel 5.5 juga didapati perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ) antara dua kelompok ini ( $p = 0,000$ ). Hal ini menunjukkan bahwa AOM dan DSS berpengaruh pada infiltrasi sel limfosit pada kolon mencit. Efek infiltratif limfosit ini sesuai dengan hasil penelitian Zaki, *et al* (2010) yang mengamati infiltrasi leukosit pada kolon setelah mengalami inflamasi akibat pemberian DSS selama 2 minggu, juga Paradisi (2009) dengan perlakuan AOM/DSS selama 10 minggu.

AOM adalah suatu karsinogen genotoksik kolon yang digunakan untuk menginduksi karsinogenesis pada hewan rodensia. Jika diberikan secara intraperitoneal, AOM dapat menyebabkan kerentanan mutasi sel saluran cerna sehingga mempersingkat waktu observasi kanker kolorektal. DSS merupakan karsinogen non genotoksik polisakarida sulfat sintetis yang menginduksi inflamasi usus (*ulcerative colitis*) pada hewan rodensia. Pemberian AOM secara intraperitoneal dan DSS secara per oral melalui air minum

menyebabkan pesatnya pertumbuhan tumor usus. Model perlakuan ini mendukung pada fokus penelitian perkembangan tumor yang didorong oleh kolitis seperti dalam kolitis ulserativa atau penyakit kron.

Clapper, *et al* (2007) dalam penelitiannya membuktikan bahwa manifestasi keganasan kolon akibat colitis (dengan induksi AOM dan DSS) berkaitan dengan peran beberapa gen spesifik seperti *Adenomatous polyposis coli* (Apc), p53, dan *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS). Model paparan inflamasi berulang menggunakan AOM dan DSS menyerupai patogenesis *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) yang disebabkan autoimun. Inflamasi kronik (berulang) pada IBD dimediasi oleh peningkatan ekspresi IL-23 (Langowski, 2006) yang menstimulasi CD4+ untuk berdiferensiasi menjadi Th17 (limfosit) dan mengeluarkan sitokin pro-inflamasi IL-17 (Liang, 2006). Selain oleh Th17, IL-17 juga dapat di sekresi oleh *innate lymphoid population* (ILC) yang mengalami akumulasi di kolon yang mengalami inflamasi (Pearson, 2012). Penelitian Kirchberger (2012) membuktikan terdapat korelasi antara akumulasi IL-17, IL-22 dan *colonic* ILC pada mencit dengan induksi AOM. Model mencit imun bawaan *colitis-associated colon cancer*, ILC yang memproduksi IL-17 dan IL-22 berperan penting dalam transisi kolitis menjadi kanker kolorektal dengan meningkatkan peradangan dan proliferasi.

Infiltrasi limfosit diduga dapat digunakan sebagai faktor prognostik pada kanker akibat proses inflamasi kronis. Meta-analisis Gooden, *et al* (2011) menyatakan bahwa observasi marker aktivasi limfosit, seperti Granzyme-B, CD25, OX40, CD69, dapat memberikan gambaran prognosis yang lebih pasti namun perlu penelitian lebih lanjut.

## 6.2 Efek pemberian ekstrak daun benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) terhadap infiltrasi sel limfosit

Dari hasil uji *one way anova* Tabel 5.4 didapatkan nilai signifikansi  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ) antara kelompok kontrol dan kelompok uji. Nilai ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan jumlah infiltrasi sel limfosit yang signifikan pada 2 atau lebih kelompok perlakuan. Oleh sebab itu dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) memiliki pengaruh yang signifikan terhadap infiltrasi limfosit pada kolon mencit yang diinduksi kanker.

Pada penelitian Widowati (2013), dibuktikan bahwa *Dendrophthoe pentandra* mampu menghambat proliferasi sel kanker, menginduksi apoptosis, mengikat radikal bebas secara bermakna dengan aktivitas anti-kanker yang dominan. Senyawa yang terkandung dalam benalu yang kemungkinan berpotensi sebagai antikanker adalah flavonoid, yakni kuersetin (Arthanti, 2006). Sifat antioksidan dan antiinflamasi kuersetin mampu menghambat proses karsinogenesis. Selain itu akan dihambat ekspresi protein p53 mutan, tirosin kinase, *heat shock protein*, dan siklooksigenase (Lamson, 2000; Garcia-Mediavilla, 2007). Menurut Santos (2014), Quercetin memiliki daya inhibisi imun kompleks yang paling efektif dibanding flavonoid lain (galangin, kaempferol, dan myricetin). Kuersetin mampu menurunkan aktivitas myeloperoksidase, namun tidak menghambat aktivitas NADPH oxidase, fagositosis, microbial killing, atau viabilitas neutrofil. Kuersetin juga dapat menghambat ROS yang dihasilkan oleh neutrofil. Berdasarkan penelitian ini, kuersetin merupakan flavonoid yang berpotensi dikembangkan sebagai terapi pendamping berbasis imun.

## 6.2 Dosis optimum pemberian ekstrak daun benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) terhadap infiltrasi sel limfosit

Pada pengujian *post-hoc* Tabel 5.5, didapati nilai signifikansi setiap perlakuan jika dibandingkan memiliki perbedaan yang bermakna ( $p=0,000$ ). Hasil ini menunjukkan bahwa perubahan atau peningkatan dosis ekstrak daun benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) dapat secara bermakna mempengaruhi infiltrasi limfosit ke jaringan kolon mencit. Pemberian dosis minimal, 100 mg/kgBB sudah cukup bermakna dalam menurunkan infiltrasi sel limfosit.

Berdasarkan rerata *post-hoc* Tabel 5.5, jumlah infiltrasi sel limfosit pada pemberian dosis ketiga, 500 mg/kgBB terhadap kontrol negatif memiliki perbedaan yang paling kecil (mean= $\pm 62.667$ ). Dapat disimpulkan bahwa dengan pemberian dosis 500 mg/kgBB dapat mensupresi infiltrasi limfosit hingga paling mendekati kondisi kolon normal dibandingkan dosis lain yang lebih rendah.

Penelitian Souto (2011) menyatakan bahwa kuersetin dapat menurunkan infiltrasi neutrofil pada kavum peritoneal yang telah diinduksi faktor kemotaktik. Kuersetin mampu menghambat polimerisasi aktin sehingga menginhibisi migrasinya ke daerah inflamasi. Menurut Guazell (2013), efek anti-inflamasi dan antioksidan flavonoid kuersetin akan lebih optimal dengan pengemasan menggunakan mikrokapsul berbahan dasar polimer pectin/casein sehingga *release* molekul aktifnya adekuat dan terkontrol. Administrasi per oral kuersetin dalam mikrokapsul terbukti menurunkan rekrutmen neutrofil, menurunkan perubahan histologis, mengurangi kerusakan makroskopis, edema dan produksi IL-1beta dan IL-33 di kolon. Kuersetin dalam mikrokapsul juga

mencegah reduksi sitokin anti-inflamasi IL-10 dan kapasitas antioksidan yang dimiliki usus besar.

Dari hasil uji korelasi parametric Pearson, nilai signifikansi  $p=0,000$  dan koefisien korelasi  $-0,977$ . Nilai ini bermakna bahwa korelasi antara pemberian ekstrak daun benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) terhadap sel infiltrasi limfosit berbanding terbalik secara signifikan. Berarti semakin tinggi dosis atau konsentrasi ekstrak yang diberikan akan diikuti semakin minimnya jumlah infiltrasi sel limfosit ke jaringan.

Terdapat beberapa step penting sehingga kuersetin dapat menyebabkan penurunan infiltrasi sel limfosit. Penurunan infiltrasi sel limfosit menandakan aktivitas inflamasi kronis pada kolon yang diinduksi dengan AOM dan DSS dapat tersupresi. Kuersetin menurunkan degradasi IkBalfa dengan menghambat upregulasi kompleks IKK (Comalada, 2005). Efek pada kaskade ini kemudian turut menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B (Shih, 2004). Pemberian kuersetin dosis tinggi sehingga menghambat NF- $\kappa$ B konsisten dengan perubahan pada iNOS, COX-2 dan ekspresi CRP pada penelitian Garcia-Mediavilla (2007).

Pada penelitian Sato (1997), flavonoid kuersetin diketahui dapat menekan ekspresi IL-8 dan MCP-1, juga menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B oleh TNF- $\alpha$  pada kultur sel synovial dari pasien rheumatoid arthritis. Efek inhibisi MCP-1 ini juga dibuktikan oleh Ishikawa, *et.al.* (1999) pada penelitian menggunakan kultur sel mesangial dan glomerulus. Dengan diinhibisinya MCP-1 sebagai *chemokine* yang merangsang migrasi limfosit ke jaringan, maka infiltrasi limfosit pada jaringan inflamasi berkurang, dimana pada penelitian ini ditandai dengan penurunan jumlah sel infiltrasi limfosit setelah pemberian

ekstrak etanol daun benalu mangga (*Dendrophloe pentandra*) yang diduga mengandung kuersetin.

Berdasarkan hasil uji Post Hoc, masih didapati perbedaan yang signifikan antara jumlah sel limfosit setelah pemberian dosis ekstrak tertinggi (500 mg/kgBB) dengan kelompok kontrol negatif (kondisi normal). Itu sebabnya diperlukan uji statistik regresi linear untuk mengetahui prediksi dosis yang diperlukan agar jumlah sel limfosit yang menginfiltrasi mendekati kondisi kolon normal. Dari hasil uji regresi linear, didapatkan dosis prediksi yang perlu diberikan pada mencit adalah 542 mg/kgBB/hari.

Penelitian ini mengalami beberapa keterbatasan. Pertama, pada penelitian ini tidak dilakukan analisis ekspresi protein permukaan limfosit. Hal ini menyebabkan tidak dapat disimpulkan tipe sel limfosit yang secara dominan menginfiltrasi kolon dari hasil pemeriksaan mikroskopis. Kedua, belum diteliti adanya efek samping pemberian efek samping ekstrak etanol daun benalu mangga (*Dendrophloe pentandra*).



## BAB 7

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, pengaruh pemberian ekstrak etanol daun benalu mangga terhadap infiltrasi sel limfosit pada mencit model *colitis-associated colon cancer*, maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

- 1) Terdapat pengaruh peningkatan infiltrasi sel limfosit pada kolon mencit setelah dipapar Azoxymetana dan Dekstran Sodium Sulfat sebagai induksi *colitis-associated colon cancer*.
- 2) Pemberian ekstrak etanol daun benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) terbukti dapat menurunkan infiltrasi sel limfosit pada kolon mencit model *colitis-associated colon cancer*.
- 3) Dosis ekstrak etanol daun benalu mangga sebesar 500 mg/kgBB menunjukkan hasil paling efektif untuk menurunkan infiltrasi sel limfosit pada kolon mencit model *colitis-associated colon cancer*.

#### 7.2 Saran

- 1) Perlu dilakukan penghitungan infiltrasi sel radang lain dan identifikasi tipe limfosit yang dominan secara molekuler pada kolon.
- 2) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek samping dari pemberian ekstrak etanol daun benalu mangga sebagai terapi pada kanker kolon.