

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Penelitian ini diawali dengan pengujian secara *in silico* menggunakan senyawa aaptamin dan cisplatin terhadap molekul DR4/TRAIL-R1. *Docking* (penambatan) merupakan jenis pendekatan secara *in silico* yang bertujuan untuk mempelajari interaksi antara protein dan ligan yang dicocokkan melalui penambatan dalam ruang tiga dimensi. Hasil dari pengujian ini yakni berupa nilai *binding affinity*. Nilai *binding affinity* Aaptamin-DR4 lebih rendah dibanding Cisplatin-DR4. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa aaptamin lebih mudah mengikat DR4 dibandingkan dengan cisplatin mengikat DR4. Semakin rendah nilai *binding affinity*, maka energi bebasnya akan semakin besar dan kecenderungan untuk berikatan dengan reseptor akan semakin kuat, begitu pula sebaliknya. Selain *binding affinity*, pendekatan *docking* juga memperlihatkan letak lokasi ikatan antara reseptor dan ligan. Dalam interaksinya dengan DR4, aaptamin berinteraksi pada lokasi yang berbeda dengan cisplatin. Hal ini menunjukkan bahwa aaptamin pada spons mungkin memiliki mekanisme kerja yang berbeda dengan cisplatin dalam berinteraksi dengan DR4. Kemampuan aaptamin dalam berinteraksi dengan DR4 masih perlu dianalisa lebih lanjut untuk mengetahui efek apa yang timbul dari interaksi tersebut. Oleh karena itu, penelitian dilanjutkan dengan pengujian secara *in vitro*.

Penelitian secara *in vitro* diawali dengan melakukan ekstraksi spons. Spons *Aaptos suberitoides* diekstrak menggunakan etanol 96% dengan metode

ekstraksi dingin yakni maserasi. Pemilihan metode maserasi pada penelitian ini didasarkan atas sifat beberapa senyawa yang terkandung di dalam spons yang tidak tahan terhadap suhu tinggi, salah satunya adalah senyawa alkaloid. Pemilihan pelarut etanol 96% didasarkan atas sifat kepolaran pelarut tersebut yang mampu menarik komponen yang terkandung di dalam spons, yakni alkaloid.

Persen rendemen menunjukkan presentase sampel sebelum dan setelah perlakuan. Persen rendemen dari bahan spons kering yang diperoleh adalah sebesar 3,96%, dimana nilai persen rendemen tersebut lebih besar dibanding penelitian yang dilakukan oleh Theresia *dkk* (2007). Besarnya persen rendemen spons laut dipengaruhi oleh morfologi dari spons, yakni spons yang teksturnya padat, lunak, halus, dan lentur seperti karet memiliki rendemen yang relatif lebih besar dibandingkan dengan spons yang teksturnya rapuh, kaku, kasar, dan mudah patah (Theresia *dkk.*, 2007). Selain itu, ukuran bahan dan proses maserasi juga mempengaruhi nilai persen rendemen, dimana bahan yang diekstrak masih berupa serbuk kasar sehingga permukaan bahan yang kontak dengan pelarut lebih kecil jika dibandingkan dengan menggunakan serbuk halus. Proses maserasi yang dilakukan pada penelitian ini sebanyak lima kali maserasi. Banyaknya jumlah maserasi juga mempengaruhi banyaknya hasil ekstrak, dimana semakin sedikit melakukan maserasi, ekstrak menjadi kurang jenuh sehingga dapat mempengaruhi persen rendemen karena pada filtrat masih terdapat komponen-komponen spons yang belum terekstrak. Semakin besar volume pelarut maka jumlah bahan yang akan terekstrak akan semakin besar sampai larutan menjadi jenuh (Houghton and Raman, 1998).

Spons *Aaptos suberitoides* merupakan spons yang kaya akan kandungan alkaloid yang terbukti memiliki efek antikanker pada beberapa sel kanker.

Kandungan alkaloid yang dilaporkan bersifat sitotoksik adalah aaptamin dan derivatnya (Meihua *et al.*, 2011). Oleh sebab itu, dilakukan uji fitokimia untuk memastikan kandungan alkaloid pada ekstrak tetap ada dan tidak hilang seiring dengan beberapa proses yang telah dilakukan sebelumnya. Berdasarkan uji alkaloid, diperoleh bahwa ekstrak spons positif mengandung alkaloid. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak dapat digunakan untuk pengujian berikutnya karena kandungan alkaloid pada ekstrak spons masih ada. Perbedaan intensitas warna dan endapan yang dihasilkan pada uji ini sekilas tidak terlalu signifikan jika dibandingkan dengan kontrol. Namun, jika dilihat dengan jarak yang sangat dekat, perbedaan dari setiap perlakuan dapat terlihat. Tidak terlalu terlihatnya perbedaan antar perlakuan dapat disebabkan karena warna dasar ekstrak yang cokelat pekat sehingga menutupi warna endapan yang terbentuk.

Apoptosis merupakan mekanisme kematian sel yang terprogram yang digunakan untuk mengontrol pertumbuhan sel atau merespon kerusakan DNA. Apoptosis terjadi melalui dua jalur, yakni jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik. Untuk menimbulkan respon, kedua jalur tersebut harus dapat menembus membran plasma atau mengalami transduksi (Nuutinen, 2009). Transduksi sinyal jalur ekstrinsik diinisiasi melalui stimulasi dari reseptor kematian (*Death Receptor*) yang terletak di permukaan sel. Reseptor kematian tersebut salah satunya adalah DR4/TRAIL-R1 (Abdelouahid *et al.*, 2013). Oleh sebab itu, penelitian selanjutnya dilakukan untuk melihat adanya aktivasi salah satu reseptor yang berperan penting pada apoptosis, yakni DR4/TRAIL-R1. DR4/TRAIL-R1 merupakan reseptor pada jalur ekstrinsik apoptosis yang ekspresinya meningkat selama karsinogenesis dan aktivasinya dikatakan mampu menginduksi apoptosis (Bodvael *et al.*, 2010).

Sebelum melihat aktivasi DR4/TRAIL-R1 pada sel, dilakukan proses kultur sel HeLa. Sel HeLa pada penelitian ini digunakan sebagai model sel kanker serviks yang akan diuji aktivasi DR4/TRAIL-R1 nya. Sel HeLa sering digunakan sebagai model dalam penelitian karena merupakan sel turunan manusia yang umum digunakan untuk kepentingan kultur sel dan memiliki sifat yang lebih cepat tumbuh sehingga mampu memproduksi lebih banyak sel. Kulturanya memiliki sifat yang semi melekat karena sel kultur melepas suatu protein matriks ekstraseluler sehingga sel-sel tersebut menempel satu sama lain dan menempel pada dasar *microplate* (Syaifuddin, 2007).

Setelah proses kultur selesai, dilakukan pengujian MTT untuk mengetahui proliferasi menggunakan dosis 33,5 µg/mL; 67 µg/mL; 134 µg/mL; dan 268 µg/mL. Nilai IC₅₀ ekstrak spons *Aaptos suberitoides* yang diperoleh adalah 57,43 µg/mL (Alifia *dkk.*, 2015). Pada penelitian ini mencoba untuk menggunakan dosis diatas IC₅₀ dengan harapan bahwa nantinya respon terhadap aktivasi DR4/TRAIL-R1 dapat meningkat karena nilai IC₅₀ pada dasarnya hanya nilai untuk mengetahui 50% sel yang mengalami proliferasi, bukan untuk melihat kematian sel. Untuk melihat adanya apoptosis, pada penelitian ini digunakan suatu parameter yang berperan penting dalam proses apoptosis, yakni DR4/TRAIL-R1 yang akan dilihat aktivasinya dengan menggunakan dosis yang sedikit lebih tinggi dari IC₅₀, yakni 67 µg/mL.

Selanjutnya dilakukan pengujian aktivasi DR4/TRAIL-R1 dengan teknik imunositokimia menggunakan dosis ekstrak spons 67 µg/mL, cisplatin, dan kontrol. Hasilnya diperoleh bahwa terdapat aktivasi DR4/TRAIL-R1 pada pemberian ekstrak spons maupun dengan cisplatin yang ditunjukkan dengan adanya indeks aktivasi DR4/TRAIL-R1 di sitoplasma sel HeLa yang cenderung

naik pada perlakuan dengan ekstrak maupun dengan cisplatin jika dibandingkan dengan kontrol. Hal ini mengindikasikan bahwa jalur apoptosis sel HeLa dari pemberian ekstrak spons *Aaptos suberitoides* mungkin melalui jalur ekstrinsik yang merupakan salah satu jalur untuk memprogram apoptosis. Jalur ekstrinsik hanya salah satu jalur apoptosis, sehingga ekstrak spons belum tentu hanya melalui jalur ekstrinsik saja, mengingat belum dilakukannya pengujian terhadap jalur apoptosis yang lain yakni jalur intrinsik. Adanya aktivasi DR4/TRAIL-R1 akibat pemberian cisplatin, menunjukkan bahwa cisplatin mungkin turut berperan dalam menginduksi aktivasi DR4/TRAIL-R1 yang merupakan reseptor pada jalur apoptosis, karena selama ini diketahui bahwa mekanisme cisplatin sebagai agen kemoterapi berfokus pada hambatan sintesis DNA dan mengganggu fungsi DNA (Medscape, 2016). Sehingga hal tersebut dapat menjadi tambahan informasi mengenai mekanisme cisplatin yang turut berperan dalam mengaktivasi DR4/TRAIL-R1. Aktivasi DR4/TRAIL-R1 pada pemberian ekstrak spons lebih rendah dibanding pemberian agen cisplatin karena pada pengujian masih digunakan ekstrak sedangkan cisplatin merupakan senyawa sintetik murni. Penggunaan bentuk ekstrak pada suatu pengujian menyebabkan banyaknya senyawa lain yang masih terkandung dalam ekstrak dan dapat mempengaruhi senyawa utama yang diharapkan yakni alkaloid aaptamin dan derivatnya. Beberapa sumber menyebutkan bahwa spons *Aaptos suberitoides* tidak hanya mengandung senyawa alkaloid, tetapi juga mengandung senyawa-senyawa seperti poliketida, peptida, dan terpena (Amir dan Budiyanto, 1996). Salah satu senyawa terpenoid yang terkandung pada spons laut yakni ircinin, dilaporkan aksinya menyebabkan G1 arrest pada sel kanker kulit (Hye *et al.*, 2005; Mayer and Gustafson, 2008). Senyawa alkaloid pada spons sendiri juga tidak hanya

aaptamin, melainkan imidazol, bromopirol, beta karbolin, alkilpiperidin, piridoakridin, serta alkaloid terpenoid dan steroid (Putra and Jaswir, 2014). Banyaknya komponen yang terkandung dalam spons *Aptos suberitoides* inilah yang dapat mempengaruhi kerja senyawa aaptamin sehingga dapat menimbulkan efek agonis maupun antagonis.

Rendahnya aktivasi DR4/TRAIL-R1 pada pemberian ekstrak, dapat juga disebabkan karena banyaknya aktivator-aktivator lain yang juga berperan dalam proliferasi maupun apoptosis sel kanker serviks sehingga ekstrak spons mungkin tidak hanya menginduksi aktivasi DR4/TRAIL-R1, tetapi juga aktivator-aktivator lain tersebut. Prosedur perlakuan dan penggunaan bahan selama kultur sel maupun teknik imunositokimia juga sangat mempengaruhi hasil, dimana proses pencucian sel HeLa sangat beresiko untuk terbuang jika tidak dilakukan dengan hati-hati, sehingga berpengaruh pada jumlah sel yang akan terlihat pada mikroskop.

Spons *Aptos suberitoides* mungkin memiliki aktivitas antikanker dalam menginduksi apoptosis pada sel HeLa melalui aktivasi pada jalur DR4/TRAIL-R1, meskipun aktivitas tersebut masih sangat rendah dibandingkan dengan agen kemoterapi cisplatin. DR4/TRAIL-R1 merupakan salah satu *death receptor* dari famili TNF selain Fas, TNF-R, dan DR5. Pada apoptosis jalur ekstrinsik, sebuah sel akan melepaskan sinyal yang biasanya disebut ligan. Ligan kemudian akan berikatan dengan DR4/TRAIL-R1, dan ikatan antara ligan dengan DR4/TRAIL-R1 akan membentuk trimer dengan adaptor yang disebut FADD yang kemudian akan merubah procaspase-8 menjadi bentuk aktifnya yaitu caspase-8. Caspase-8 selanjutnya akan mengaktivasi caspase-3 sebagai titik akhir pemrograman kematian sel secara ekstrinsik.

Pemberian ekstrak spons maupun cisplatin mempengaruhi aktivasi DR4/TRAIL-R1, namun pengaruhnya belum dapat dikatakan signifikan karena data yang digunakan hanya pada satu lapang pandang sehingga tidak mewakili seluruh populasi. Selain itu, pada penelitian ini tidak dilakukan pengulangan sehingga data yang diperoleh tidak diketahui keseragaman variasi, standar deviasi, dan signifikansinya. Hal ini terjadi karena keterbatasan bahan serta kondisi sel HeLa yang sangat sulit untuk konfluen (merata) sehingga mempengaruhi waktu penelitian. Sel HeLa dapat digunakan untuk penelitian jika telah konfluen (70-80% sel memenuhi dinding *flask*) karena pada kondisi tersebut jumlah sel telah mencukupi untuk dilakukan pengujian. Kondisi laboratorium adalah faktor penting yang mempengaruhi konfluennya sel HeLa.

6.2 Implikasi terhadap Bidang Farmasi

Dalam melakukan penelitian berbasis bahan alam, seorang farmasi harus lebih memperhatikan metode ekstraksi yang dipilih dan tidak hanya berfokus pada kandungan zat aktif utama, tetapi semua komponen perlu diperhatikan. Selain itu, seorang farmasi harus mulai berkembang ke arah biomolekuler agar mekanisme terapi dapat diketahui secara jelas.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan penelitian ini adalah belum dilakukan uji fitokimia secara kuantitatif untuk mengetahui jenis dan jumlah komponen yang ada pada ekstrak spons secara keseluruhan. Pada penelitian ini, mekanisme apoptosis sel HeLa hanya dilihat melalui jalur ekstrinsik (dengan indeks aktivasi DR4/TRAIL-R1) tanpa melihat komponen jalur intrinsik.