

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 HASIL PENELITIAN

Dalam penelitian ini digunakan dua protein yaitu *lysenin* dan *sphingomyelin* yang masing-masing memiliki fungsi sebagai agen untuk mengapoptosis dan melisiskan sel kanker kolon. Teknik yang digunakan untuk mendapatkan hasil maksimal dari penelitian ini adalah teknik *docking* yang menggunakan visualisasi komputer dari ikatan protein tersebut.

Menurut penelitian didapatkan bahwa *lysenin* pada cacing tanah *Eisenia fetida*, yang dihasilkan dari *coelomic fluid* cacing tersebut yang merupakan bagian dari imun sistem cacing tanah. *Lysenin* termasuk bagian dari *family aerolysin small β -pore-forming toxins (β -PFTs)* yang termasuk faktor virulensi utama dari sejumlah patogen bakteri, seperti *aerolysin* yang dihasilkan dari *Aeromonas spp*, *Clostridium perfringens epsilon toxin* dan *Clostridium septicum α -toxin*, sedangkan *Bacillus thuringiensis parasporin-2* memiliki aktivitas sitokidal yang melawan sel kanker pada manusia. Sama seperti kebanyakan PFTs, *lysenin* yang disekresikan berupa protein inaktif, *water soluble* monomer. Pada ikatannya dengan *sphingomyelin* pada membran sel eukariotik, toksin mengalami perubahan yang signifikan terhadap struktur sekunder dan menghasilkan oligmer *pre-pore* pada permukaan membran yang diidentifikasi dengan *electron crystallographic* dan studi *high-speed atomic force microscopy* sebelum dimasukan ke membran yang mana memicu terbentuknya pore dan lisis sel. Dari hasil investigasi dari struktur monomer *lysenin* yang berikatan dengan *sphingomyelin* terbukti bahwa kedua kepala *phosphocholine* dan satu rantai ekor akil dair *sphingomyelin* dibutuhkan untuk ikatan toksin (Brown, 2016).

Terdapat sejumlah bukti bahwa *lysenin* berikatan secara spesifik dengan *sphingomyelin* dalam membran plasma. Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa *lysenin* mengenali struktur molekuler *sphingomyelin* yang tepat. Di dalam molekul *sphingomyelin*, *lysenin* membutuhkan fosforilkolin, sphingosin dan gugus asam lemak untuk proses pengikatan. Peneliti menemukan bahwa rekombinan *His-tagged lysenin* mengenali *sphingomyelin* dengan spesifisitas yang sama. Penambahan kolesterol ke membran sintetik berbasis *sphingomyelin* secara signifikan meningkatkan total jumlah *lysenin* yang berikatan dengan membran. *Surface plasmon resonance* membuktikan bahwa penambahan kolesterol tidak mengubah parameter kinetik interaksi *lysenin*–*sphingomyelin*, menunjukkan bahwa penambahan kolesterol dapat mengubah distribusi topologi *sphingomyelin* di dalam membran, sehingga meningkatkan aksesibilitas *sphingomyelin* menuju *lysenin*. Interaksi *lysenin* dengan *sphingomyelin* dipengaruhi oleh gula dan molekul protein dari permukaan sel atau oleh metode fiksasi (2 – 4% paraformaldehid, 10 mM natrium periodat/formaldehid), tetapi interaksi *lysenin/sphingomyelin* hilang saat sel tersebut difiksasi dan dipermeabilisasi dengan alkohol (Shakor, 2003).

Pada penelitian ini didapatkan hasil dari *docking* antara *lysenin* dan *sphingomyelin* menghasilkan kekuatan ikatan sebesar -4.0 yang dapat diartikan bahwa ikatan antara *lysenin* dan *sphingomyelin* memiliki makna dapat dijadikan sebagai bahan dasar penelitian ini. Dan hasil dari persamaan antara kontrol dan jenis ikatan baru (*lysenin sphingomyelin*) sebesar 61.5% yang dapat diartikan bahwa kompleks ikatan hasil pendocking ini memiliki kemiripan dengan kontrol walaupun tidak signifikan sehingga kompleks ikatan baru tersebut dapat dijadikan bahan utama pada penelitian kali ini. Hasil tersebut didapatkan dari perbandingan asam amino kontrol dengan hasil pendocking baru. Pada

kompleks ikatan *lysenin* dan *sphingomyelin* baru didapatkan 8 asam amino yang sama dengan kontrol diantara lain ; treonina, serina, glisina, triptofan, valina, isoleusina, dan arginina.

Adapun nantinya kompleks ikatan baru ini diharapkan mampu membantu kerja dari 5-FU sebagai agen kokemterapi dari kanker kolon walaupun jalur dari kerja kompleks ikatan *lysenin sphingomyelin* baru ini berbeda dengan 5-FU. 5-FU memiliki mekanisme kerja dengan cara 5-FU dikonversikan secara intraselular yang menjadi metabolisme aktif seperti *fluorodeoxyuridine monophosphate* (FdUMP), *fluorodeoxyuridine triphosphate* (FdUTP) dan *fluorouridine triphosphate* (FUTP), yang aktivasi dari ketiga metabolisme ini mengganggu dari sintesis RNA dan kerja dari *thymidylate synthase*. Enzim yang membatasi laju pada katabolisme 5-FU adalah *dihydropyrimidine dehydrogenase* (DPD), yang menkonversikan 5-FU menjadi *dihydrofluorouracil* (DHFU). Lebih dai 80% dari adminstrasi 5-FU normalnya dikatabolisme awal di liver yang dimana DPD di ekspresikan. Sedangkan inhibisi dari *thymidylate synthase* memiliki jalur yang berbeda. Seperti yang sudah diketahui bahwa enzim *thymidylate synthase* dapat mengkatalisis konversi dari *deoxyuridine monophosphate* (dUMP) menjadi *deoxythymidine monophosphate* (dTMP) dengan 5, 10 -*methylene tetrahydrofolate* (CH₂THF) sebagai donor *methyl*. Metabolit aktif dari 5-*fluorouracil* (5-FU) *fluorodeoxyuridine monophosphate* (FdUMP) berikatan dengan sisi ikatan nukleotida pada *thymidylate synthase* dan membentuk kompleks stabil *ternary* dengan *thymidylate synthase* dan CH₂THF, menutup akses dari dUMP ke sisi ikatan nukleotida dan menghambat sintesis dTMP. Hasil dari ketidak seimbangan dari *deoxynucleotide* (dNTP) dan meningkatnya level *deoxyuridine triphosphate* (dUTP) dapat menyebabkan kerusakan pada DNA (Longley, 2003).

Sedangkan berbeda halnya dengan kompleks ikatan *lysenin sphingomyelin* yang memiliki jalur tersendiri untuk mengapoptosis dan melisiskan suatu sel. Mekanisme molekuler kerusakan membran yang disebabkan oleh lysenin tidak diketahui dengan jelas, meskipun mekanisme tersebut tidak mengikuti kerja sphingomyelin. Kehadiran sekuens lysenin yang mampu membentuk suatu domain transmembran masih dipertanyakan, oleh karena itu protein dapat melekat pada permukaan membran tanpa penetrasi dari lapisan bilayer membran. Selanjutnya, domain hidrofobik lysenin dapat menyebabkan distorsi lokal lapisan lipid. Selain itu, perubahan lysenin menjadi oligomer tidak dapat diabaikan, karena fetidin dan eiseniapore, protein E. foetida lainnya, terbukti mengalami oligomerisasi selama interaksi dengan membran yang mengandung sphingomyelin. Diduga bahwa akumulasi sphingomyelin pada mikrodoman membran berbeda seperti *raft* kaya sphingolipid/kolesterol kaya dapat menyebabkan mikrodoman sangat rentan terutama terhadap pengikatan lysenin. Kompleks lysenin-sphingomyelin terkonsentrasi di dalam mikrodoman dapat menimbulkan kerusakan lokal pada membran plasma, diikuti dengan lisis sel. Dari sudut pandang tersebut, penelitian mengenai sitolisis yang diinduksi oleh lysenin dapat membantu untuk mengungkapkan jika perubahan *lipid rafts* mampu menginduksi kematian sel. Terdapat beberapa cara dimana kompleks lysenin/sphingomyelin dapat meningkatkan kebocoran membran, salah satunya berkaitan dengan destabilisasi bilayer akibat perubahan lokal pada kurvatura membran. Mekanisme kerja tersebut dideskripsikan untuk protein pro-apoptosis tBid dalam membran mitokondria. Peneliti menduga bahwa setelah permeabilisasi membran plasma, lysenin dapat mengakses ke *pool* mitokondria sphingomyelin dan sitotoksisitas protein mengalami augmentasi (Shakor, 2003)

Dari hasil docking ditemukan bahwa kompleks ikatan *lysenin sphingomyelin* mampu berikatan dengan hnRNP M4 yang merupakan kompleks membran yang terdapat pada sel kanker kolon (HT-29) yang memiliki kekuatan ikatan sebesar -4.8 yang termasuk ikatan lemah (normal -7.3). Namun dari adanya kekuatan ikatan tersebut membuktikan bahwa *lysenin sphingomyelin* mampu berikatan dengan hnRNP M4 yang nantinya setelah itu kompleks ikatan *lysenin sphingomyelin* akan masuk dan melisiskan sel kanker kolon seperti penjelasan diatas. Namun tidak hanya itu karena seperti yang diketahui bahwa hnRNP M4 juga berikatan dengan CEAR (*Carcinoembryonic antigen reseptor*) yang dimana merupakan reseptor dari CEA (*Carcinoembryonic antigen*) yang merupakan suatu protein yang mampu melindungi sel kanker kolon dari apoptosis dan mampu menginduksi signal aktivasi induksi. CEA juga digunakan sebagai penanda dari kanker kolon dan juga berperan untuk melihat progres dari kanker kolon sendiri. CEA dapat ditemukan 90% pada kanker kolon, 60% pada kanker payudara, kanker paru, dan kanker pankreas (Luciana, 2005). Dari penelitian ini diharapkan dengan adanya ikatan lemah antara kompleks ikatan *lysenin sphingomyelin* mampu menjadikan agen terapi atau agen pembantu terapi kanker kolon bersama dengan 5-FU dengan jalur yang berbeda dan kerja yang berbeda (Laguinge, 2005).