

BAB 6

PEMBAHASAN

Kanker payudara adalah *malignant tumor* (tumor yang berbahaya) yang berasal dari sel-sel pada jaringan payudara (ACS, 2013). Pada wanita, kanker payudara adalah kanker dengan diagnosa paling tinggi yaitu sebesar 23% dari semua kasus baru pada wanita. Sedangkan di Indonesia kanker payudara adalah kanker dengan insiden dan mortalitas tertinggi pada wanita (WHO, 2011).

Penelitian eksperimental ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak *Moringa oleifera* terhadap ekspresi *Heat Shock Protein-70* (Hsp70) dan apoptosis sel MCF-7 kanker payudara secara *in vitro*. Pada penelitian sebelumnya, diketahui bahwa daun kelor memiliki kandungan utama flavonoid quercetin-3-O-glucoside dan kaempferol-3-O-glucoside yang berperan sebagai antioksidan dalam melawan radikal bebas, menghambat pertumbuhan sel kanker dan meningkatkan apoptosis sel kanker. Selain itu secara *ethnomedicine*, daun kelor telah terbukti memiliki khasiat antikanker (Zorzi, 2011; Tiloke et al, 2013; Balachandran et al, 2005).

Metode ekstraksi yang dilakukan pada penelitian ini adalah metode ekstraksi maserasi. Ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi dilakukan karena kandungan flavonoid pada daun kelor tidak tahan terhadap panas. Pelarut yang digunakan adalah pelarut ethanol 70% karena ethanol lebih dapat mengekstraksi kandungan polifenol dibandingkan pelarut lainnya. Selain itu, Ethanol juga dapat digunakan untuk tujuan penggunaan oral karena tidak bersifat toksik.

Dari hasil uji kualitatif ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) diketahui bahwa ekstrak daun kelor memiliki kandungan flavonoid, fenol, alkaloid, saponin, tanin, tetapi tidak mengandung terpenoid. Sedangkan menurut Josephine (2010), pada daun moringa oleifera terdapat pula kandungan terpenoid. Pada uji kualitatif fitokimia tidak ditemukan adanya terpenoid kemungkinan karena adanya perbedaan lama waktu dan pelarut maserasi mempengaruhi hasil uji kualitatif. Metode ekstraksi pada Josephine (2010) adalah maserasi menggunakan pelarut dietil eter (98%) dan pengadukan dilakukan setiap dua jam sekali selama 72 jam. Sehingga adanya perbedaan waktu ekstraksi dan pelarut ekstraksi kemungkinan berperan dalam perbedaan hasil kandungan kimia pada uji fitokimia secara kualitatif.

MTT assay dilakukan untuk menentukan IC_{50} (*Inhibition Concentration 50%*) daun kelor *Moringa oleifera* yang memiliki aktivitas hambatan proliferasi pada sel kanker payudara MCF-7 sebesar 50%. Prinsip kerja MTT assay adalah mengukur aktivitas selular berdasarkan aktivitas enzim succinic dehydrogenase mitokondria sel untuk mereduksi garam methylthiazol tetrazolium (MTT). Pada proses metabolisme, sel hidup akan menghasilkan enzim succinic dehydrogenase mitokondria yang kemudian akan bereaksi dengan MTT dan membentuk kristal formazan ungu. Kristal formazan ungu yang telah dilarutkan diukur dengan ELISA reader sehingga menghasilkan nilai absorbansi. Selanjutnya persen hambatan proliferasi dinyatakan dengan membandingkan nilai kontrol dikurangi nilai absorpsi dengan nilai kontrol (Sitorus, 2008). Pada penelitian sebelumnya, IC_{50} daun kelor pada kanker pankreas sebesar 1100 $\mu\text{g/ml}$ (Berkovich *et al.*, 2013) dan pada kanker kolon tipe sel HCT15, SW48, dan SW480 adalah 264,83; 102,40; dan 197,20 $\mu\text{g/ml}$ (Paliwal *et al.*, 2011).

Penelitian tersebut menjadi dasar penggunaan dosis pada MTT assay penelitian ini, sehingga digunakan konsentrasi pada rentang 50 – 700 µg/ml dan seri konsentrasi pada rentang 7,8125 – 1000 µg/ml. Namun pada percobaan MTT assay pertama belum didapatkan IC₅₀, sehingga dilakukan optimasi konsentrasi yang lebih tinggi dengan MTT assay yang kedua dengan konsentrasi pada rentang 1200 – 6400 µg/ml dan seri konsentrasi 125 – 10000 µg/ml. IC₅₀ yang diperoleh sebesar 2200 µg/ml pada sel kanker payudara MCF-7 pada penelitian ini. Hasil ini diperoleh berdasarkan perhitungan dari persamaan kurva regresi.

Pada penelitian sebelumnya, telah dibuktikan bahwa pada sel kanker payudara terdapat ekspresi *Heat Shock Protein 70* (Hsp70) yang berlebihan. Adanya ekspresi Hsp70 yang berlebihan ini diakibatkan karena adanya kondisi fisiologis maupun lingkungan yang dapat mengakibatkan kerusakan sel, seperti toksin eksogen, panas, stres oksidatif, dan iskemia (Rérole *et al*, 2011). Stress akut dan kronik yang terjadi dapat mengakibatkan terurainya struktur protein (*protein misfolding*), agregasi protein (*protein agregation*), dan kerusakan kompleks pengaturan. Pada kondisi normal, protein Hsp70 berfungsi sebagai molekul *chaperon ATP-dependent* yang bekerja dalam pelipatan polipeptida yang baru disintesis, pembentukan kompleks multi protein dan transport protein melewati membran seluler (Cecconi, 2010). Pada kondisi stres, Hsp70 mengenali adanya denaturasi, protein metastabil dan menghindari degradasi dini yang tidak diinginkan (pelipatan kembali protein) (Whitesell, 2009). Sehingga adanya ekspresi berlebihan dari Hsp70 dapat meningkatkan pertumbuhan sel kanker payudara, resistensi kemoterapi, penekanan pada system imun, prognosis penyakit dan potensial

metastasis (penyebaran kanker ke bagian tubuh yang lain). Sifat Hsp70 yang sitoprotektif juga menjadikannya berfungsi sebagai anti apoptosis pada sel kanker (Rérole, 2011).

Berdasarkan hasil penelitian ini, *Moringa oleifera* telah mempunyai hasil positif dalam menurunkan ekspresi Hsp70. Konsentrasi ekstrak 1100 µg/ml, 2200 µg/ml, dan 4400 µg/ml terbukti secara signifikan menurunkan ekspresi Hsp70 pada sel MCF-7 dibandingkan dengan kontrol. IC_{50} *Moringa oleifera* pada sel MCF-7 adalah 2200 µg/ml. Konsentrasi optimum ekstrak *Moringa oleifera* yang efektif dalam menurunkan ekspresi Hsp70 adalah 2200 µg/ml. Pada pemaparan dengan konsentrasi ekstrak 1100 µg/ml telah menunjukkan penurunan ekspresi Hsp70 secara signifikan dibandingkan kontrol. Pada pemaparan dengan konsentrasi 2200 µg/ml dapat menurunkan ekspresi Hsp70 secara signifikan daripada konsentrasi sebelumnya. Namun peningkatan konsentrasi menjadi 4400 µg/ml menunjukkan peningkatan ekspresi Hsp70 secara signifikan dibandingkan konsentrasi sebelumnya. Namun ekspresi Hsp70 pada pemaparan konsentrasi ekstrak 4400 µg/ml, masih lebih rendah daripada ekspresi Hsp70 pada kelompok kontrol dan kelompok konsentrasi 1100 µg/ml. Belum diketahui secara pasti penyebab dan mekanisme terjadinya peningkatan ekspresi Hsp70 pada pemaparan konsentrasi ekstrak 4400 µg/ml. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk memperbanyak rentang penggunaan konsentrasi ekstrak *Moringa oleifera* sehingga diketahui konsentrasi maksimum *Moringa oleifera* dalam menurunkan ekspresi Hsp70.

Peningkatan Hsp70 pada kelompok perlakuan disebabkan daun kelor memiliki komponen utama Flavonoid yang berperan sebagai antioksidan seperti

quercetin-3-O-glucoside dan kaempferol-3-O-glucoside. Flavonoid quercetin (3,3',4',5,7- pentahydroxyflavone) adalah Hsp70 inhibitor yang dapat menunjukkan efek penurunan ekspresi Hsp70 melalui penghambatan fosforilasi HSF1 dan aktifitas transkripsional. Selain itu terjadi pula penghambatan ekspresi dan aktifitas protein kinase yang berperan dalam pertumbuhan dan pertahanan sel kanker seperti aktifitas transkripsional HSF1 yang rendah dan ekspresi Hsp70 yang berlebihan (Zorzi, 2011).

Pada pengamatan apoptosis menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x tidak dapat dilihat bentuk sel secara jelas sel yang mengalami apoptosis, sehingga perhitungan sel secara kuantitatif tidak dapat dilakukan. Hal ini diduga bisa disebabkan karena sel mengalami nekrosis, kesalahan dalam penyimpanan sel, ataupun ketidaktepatan waktu inkubasi, ataupun kesalahan perlakuan diluar perkiraan peneliti. Sehingga apoptosis sel MCF-7 hanya dilihat secara kualitatif, dengan mengamati gradasi warna coklat yang tampak. Hasil TUNEL assay menunjukkan sel berwarna coklat jika terjadi apoptosis (Kyrylkova *et al.*, 2012). Dari gambar hasil penelitian ini kelompok kontrol berwarna coklat sangat pudar, kelompok dosis $\frac{1}{2}xIC_{50}$ berwarna coklat muda, kelompok dosis $1xIC_{50}$ berwarna coklat, dan kelompok dosis $2xIC_{50}$ berwarna coklat agak tua. Dikarenakan pembacaan apoptosis ini bersifat subjektif, maka pada penelitian ini belum dapat dilihat pengaruh ekstrak daun kelor terhadap apoptosis sel MCF-7. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut agar pengaruh ekstrak daun kelor terhadap apoptosis sel MCF-7 dapat dilihat.

Proses apoptosis diaktivasi oleh berbagai macam jalur baik intrinsik maupun ekstrinsik. Kedua jalur tersebut dimediasi oleh berbagai *cystein proteases (caspase)*. Jalur ekstrinsik dipicu melalui protein membran plasma dari golongan reseptor *Tumor Necrosis Factor (TNF)* yaitu reseptor kematian sel dan dapat mengaktifkan langsung reseptor caspase-8 sehingga terjadi apoptosis. Sedangkan jalur intrinsik melibatkan aktivasi molekul pro – apoptosis pada sinyal stres intraseluler. Bcl - 2 merupakan protein anti-apoptosis. Sedangkan Bax dan Bid merupakan protein pro – apoptosis. Salah satu molekul mitokondria yang dikeluarkan adalah sitokrom c , yang berinteraksi dengan *apoptosis protease aktivasi factor - 1 (Apaf - 1)* sitosol untuk membentuk apoptosome yang mengaktifkan procaspase - 9 dan akhirnya mengaktifkan caspase – 3 sehingga terjadi apoptosis. Namun proses apoptosis ini dapat dihambat oleh beberapa protein anti-apoptosis, seperti Heat Shock Protein 70 (Hsp70). Hsp70 bekerja dengan menghambat translokasi Bid dan Bax, menghambat pelepasan sitokrom c dan interaksinya Apaf – 1. Hsp70 juga menghambat apoptosis dengan penghambatannya terhadap CAD dan pembelahan GATA1 (Ceconi, 2010).

Moringa Oleifera dapat dipertimbangkan sebagai salah satu alternatif terapi kanker payudara dan mempotensiasi terapi konvensional yang lain. Tingginya ekspresi Hsp70 pada kanker payudara menyebabkan sel resisten terhadap terapi obat (Maureen, 2013). Jika ekspresi Hsp70 dapat diturunkan oleh *Moringa oleifera*, maka akan meningkatkan potensi terapi konvensional.