

## BAB VI PEMBAHASAN

### 6.1 Pengaruh pemberian Bromelain terhadap ekspresi *VEGFR-2*

Rata-rata persentase ekspresi *VEGFR-2* pada kontrol 59.67% sedangkan pada dosis 50 µg 19.38% , 100 µg 17.12% , 200 µg 16.39%. Hasil ini dikatakan signifikan dalam uji normalitas Saphiro Wilk serta dalam Uji Statistik Anova dikatakan signifikan ( $p < 0.05$ ). Dengan melihat hasil pembacaan ekspresi *VEGFR-2* dengan dosis yang semakin besar semakin sedikit ekspresi *VEGFR-2* yang terbaca menunjukkan bahwa Bromelain menghambat faktor-faktor pro angiogenesis dengan perbandingan persentase luas ekspresi *VEGFR-2* yang terbaca antara kontrol dengan berbagai dosis berbeda cukup jauh.

Bromelain mengganggu HIF dengan cara menghambat aktivasi jalur *NF-κB* yang diperlukan untuk menciptakan kondisi hipoksia. Selain itu hipoksia juga memainkan peran penting dalam plasenta dan vaskularisasi embrionik yang kemudian menyebabkan VEGF menurun (Ancar dan Chardonens , 2003). Selain menghambat aktivasi jalur *NF-κB*, bromelain juga menurunkan regulasi fosforilasi AKT. Dengan berkurangnya regulasi fosforilasi AKT ini menghambat *signaling VEGFR-2* (Mohr dan Desser, 2013). Selain itu, terjadi *downregulation* yaitu turunnya ekspresi VEGF menyebabkan berkurangnya ekspresi *VEGFR-2* (Tamella, 2005). Hal ini merupakan alasan penurunan ekspresi *VEGFR-2* dalam penelitian ini. Semakin besar dosis yang dipakai semakin menghambat *signaling VEGFR-2* yang juga artinya menghambat proses angiogenesis yang terjadi. Hasil pada penelitian ini menunjukkan bromelain menurunkan ekspresi *VEGFR-2* embrio ayam pada inkubasi 48 jam.

## 6.2 Pengaruh pemberian bromelain berbagai dosis pada *survival rate* pada embrio ayam usia 48 jam

Proses embriogenesis diawali dari perkembangan proses vaskuloangiogenesis yang akan menggantikan proses difusi sebagai sistem transportasi nutrisi dan O<sub>2</sub> pada embrio (Crivellato, 2011). Proses tersebut didukung oleh berbagai faktor molekular baik pertumbuhan dan transkripsi sebagai pro angiogenik bagi embrio contohnya : *VEGF*, *bFGF*, *TGF-β*, dan masih banyak lagi faktor pendukung lainnya baik molekular maupun seluler. (Adams and Alitalo, 2007)

Berdasarkan data hasil penelitian *survival rate* pada kontrol, yang diberi injeksi PBS 200 µl mencapai 92.9 %. Sedangkan pada pemberian Bromelain dosis 50 µg, *survival rate* mulai menurun menjadi 36.7%, pada dosis 100 µg *survival rate* meningkat menjadi 60%. Sedangkan pada pemberian Bromelain dosis 200 µg *survival rate* menjadi 59.3%. Berdasarkan Uji Chi-Square hasil ini menunjukkan hasil yang signifikan. Pada dosis 100 µg dan 200 µg persentase menunjukkan persentase yang hampir mirip mungkin dikarenakan dosis tersebut sudah mulai jenuh. Meskipun terjadi peningkatan *survival rate* dengan bertambah besarnya dosis tetapi peningkatan tersebut lebih rendah dibandingkan dengan kontrol.

Bromelain mengganggu angiogenesis dengan menurunkan ekspresi VEGF melalui NF-κB pathway yang mengganggu HIF juga. Terdapat penelitian yang menunjukkan bahwa pembentukan pembuluh darah yang dipengaruhi oleh VEGF menyebabkan pertumbuhan pembuluh darah yang bocor dan belum matang, tapi pembentukan pembuluh darah yang dipengaruhi oleh HIF-1α menyebabkan pembuluh darah stabil (Yancopoulos et al, 2000). Ketidakstabilan pembuluh darah yang terbentuk juga mempengaruhi keberhasilan angiogenesis.

Dengan hasil yang semakin besar dosis terjadi peningkatan *survival rate* dapat diduga bromelain tidak mengganggu keberhasilan hidup tapi ketika embrio sudah hidup dan tumbuh baru terpengaruh dengan fungsi bromelain dalam menghambat faktor perkembangan angiogenesis. Hal ini terjadi berkaitan dengan fenomena *all-or-none* di mana paparan dapat menyebabkan hidup semua atau sebaliknya yang terjadi mati semua. Belum ada penjelasan yang lebih rinci mengenai bagaimana fenomena ini terjadi (Adam, 2012). Fenomena ini tidak hanya terjadi pada penelitian ini tapi juga pada penelitian mengenai quercetin pada embrio ayam usia 48 jam juga yang memiliki mekanisme yang mirip dalam mengganggu proses angiogenesis yaitu dengan menurunkan ekspresi *HIF*. Terjadi fenomena yang sama dimana hasil *survival rate* yang polanya hidup mati hidup mati kontrolnya (dosis 0 µg) 71.42% ,pada dosis 5 µg 15.38% ,dosis 7.5 µg 0% sedangkan dosis 10 µg 33.33% (Ovianti, 2014).

### **6.3 Hubungan penurunan ekspresi *VEGFR-2* dengan *survival rate* dengan pemberian bromelain berbagai dosis pada embrio ayam usia 48 jam**

*Survival rate* pada penelitian ini ditujukan untuk melihat keberhasilan angiogenesis yang terjadi. Bromelain mengganggu angiogenesis dengan menurunkan ekspresi *VEGF* melalui *NF-kB pathway* yang mengganggu *HIF* juga (Yancopoulos et al, 2000). Ketidakstabilan pembuluh darah yang terbentuk juga mempengaruhi keberhasilan angiogenesis. Pada penelitian ini *survival rate* dihubungkan dengan semakin menurunnya ekspresi *VEGFR-2*, karena *VEGFR-2* merupakan Reseptor yang berkaitan dengan proses angiogenesis yang terjadi seharusnya ketika ekspresi *VEGFR-2* menurun akan mempengaruhi keberhasilan angiogenesis. Ketika proses angiogenesis tidak berhasil atau kurang sempurna terjadi maka akan terjadi kematian embrio karena itu seharusnya *survival rate*

menurun seiring dengan peningkatan dosis bromelain (Adams dan Alitalo, 2007). Dalam penelitian ini hasil uji korelasi Spearman menunjukkan hasil yang tidak signifikan dan koefisien korelasi 0.400 yang berarti korelasinya rendah. Hal ini diduga berkaitan dengan hasil *survival rate* yang dipengaruhi oleh bromelain berbagai dosis terjadi fenomena *all-or-none*. Kemungkinan hal ini dipengaruhi juga oleh faktor-faktor pertumbuhan lain seperti PIGF, angiopoietin dan ephrin. Ada kemungkinan juga bromelain menurunkan ekspresi VEGFR-2 berkaitan dengan VEGF tetapi menaikkan ekspresi faktor pertumbuhan lain yang dapat menyokong kehidupan embrio sehingga embrio dapat tetap hidup meskipun ekspresi VEGFR-2 menurun. Selain itu hasil yang menunjukkan korelasi rendah ini dapat dikarenakan tidak semua hasil perhitungan dalam *survival rate* dihitung ekspresi VEGFR-2 karena ada hasil yang benar-benar mati embrio tidak berkembang.

Berdasarkan kepada penelitian yang telah terlaksana, peneliti menemukan berbagai hambatan yang diharapkan dapat dievaluasi dan menjadi bahan pertimbangan dalam melakukan penelitian yang serupa atau penelitian lanjutan untuk ke depannya. Mencari pemasok telur fertile yang mau menyuplai penelitian ini tergolong susah dan harga telur yang relatif mahal per butirnya. Kemudian lokasi pembelian telur yang jauh dari tempat inkubasi telur.

Keterbatasan lainnya dalam penelitian ini adalah hasil penelitian yang menunjukkan pengaruh bromelain pada proses angiogenesis embrio ayam belum bisa digeneralisasikan kepada embrio manusia ditinjau dari aspek dosis yang digunakan. Faktor induk merupakan faktor yang paling berperan dalam proses ini. Pada penelitian ini dengan menggunakan embrio ayam, paparan bromelain langsung ditujukan pada embrio. Sedangkan pada manusia, diduga terdapat pengaruh dari ibu yang bisa menimbulkan pengaruh pada proses farmakokinetik dari

bromelain terhadap embrio meskipun bromelain dapat menembus sawar plasenta dari ibu ke anak (Kalimanovska, 1987).

#### 6.4 Implikasi Terhadap Bidang Kedokteran

Bromelain adalah zat yang berasal dari ekstrak buah nanas (*Ananas Comosus*) yang juga berisi banyak komponen dan macam-macam protease yang lain. Mekanisme kerja bromelain sebagai anti angiogenik dapat dihubungkan dengan mekanisme pertumbuhan kanker dengan menghambat faktor perkembangan vascular. Bromelain menghambat kanker dengan berperan sebagai agen anti inflamasi dan agen anti tumor yang dapat mempengaruhi peningkatan  $IFN-\gamma$ ,  $TNF \alpha$  dan penurunan COX-2 dan PGE-2 selain itu bromelain menghambat *NF- $\kappa$ B pathway* yang mana juga menurunkan COX-2 dan PGE-2. Yang akan mempengaruhi HIF kemudian yang akan menunjukkan berkurangnya VEGF dan mempengaruhi angiogenesis menjadi berkurang juga. Karena proses vaskulogenesis pada sel-sel kanker memiliki mekanisme yang sama dengan perkembangan pada embrio maka dari itu dapat terjadi penghambatan dibentuknya VEGF juga pada penelitian ini.

Penelitian mengenai pengaruh bromelain pada embrio sendiri saat ini masih sangat terbatas. Pada manusia kebanyakan penelitian membahas tentang bromelain sebagai anti inflamasi untuk terapi berbagai macam inflamasi. Belum ada penelitian yang membahas pengaruhnya pada ibu hamil secara langsung. Ibu hamil pada umumnya rentan terhadap pengaruh dari lingkungan yang dapat mempengaruhi perkembangan embrio juga. Pada penelitian ini, bromelain diketahui dapat mempengaruhi proses angiogenesis sehingga berdampak pada kelainan tumbuh kembang yang terjadi pada embrio. Oleh karena itu, kemungkinan jika ibu hamil mengkonsumsi bromelain juga dapat berdampak pada tumbuh kembang bayinya.

Peneliti menganjurkan untuk mengurangi konsumsi berlebih dari bromelain dalam keadaan hamil.

