

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Potensi Supernatan Yogurt LBA-ST terhadap Ekspresi Laminin5- γ 2 pada Sel HeLa

Metode pengujian ekspresi Laminin5- γ 2 pada sel HeLa (sel line kanker serviks) dilakukan dengan metode imunositokimia. Imunositokimia merupakan suatu metode dalam mendeteksi antigen dengan cara memberikan suatu antibodi yang akan berikatan dengan pasangan antigen tersebut. Ikatan Antibodi dengan antigen ini akan terdeteksi dengan adanya indikator warna coklat. Hal ini menunjukkan adanya ikatan antara antigen dan antibodi yang nantinya menunjukkan adanya ekspresi dari Laminin5- γ 2.

Laminin5- γ 2 merupakan salah satu marker utama dalam proses invasi, adhesi dan migrasi dan terekspresi tinggi pada sel kanker khususnya sel kanker squamosa (SCC). Hal ini menunjukkan adanya peranan penting Laminin5- γ 2 pada proses proliferasi dan metastasis sel kanker serviks melalui jalur tersebut. (Skylberg, Barbro *et al*,1999). Laminin5- γ 2 adalah glycoprotein yang berada pada zona membrane basalis (BMZ) dengan memiliki variasi rantai yakni γ 2, β 3 dan α 3. Variasi rantai ini memiliki fungsi yang berbeda-beda sesuai dengan ikatan pada reseptor Laminin5- γ 2 yakni α 3 β 1, α 6 β 4 , EGFR . reseptor integrin ini memiliki fungsi yang berbeda yakni salah satunya Focal adhesi , SACs , migrasi dan invasi sehingga menunjang adanya perkembangan sel kanker. Namun dalam proses perkembangan sel kanker skuamosa (SCC) pada kanker serviks, Laminin5 dengan rantai γ 2 memiliki peranan berarti dengan cara berikatan pada reseptor pertumbuhan sel epitel (EGFR). Hal ini menimbulkan

adanya stimulasi adanya pertumbuhan sel epitel secara berlebihan dan adanya fungsional sel seperti adhesi dan migrasi akan teraktivasi juga melalui aktivasi RAC1 (Marinkovich, M. Peter, 2007).

Aktivasi RAC1 memberikan sinyal sel invasi untuk melakukan fungsi migrasi (perpindahan sel) dan adhesi (penempelan sel), Lalu proses invasi berlangsung sesaat setelah sel kanker dapat menempel pada reseptor Laminin5- γ 2 sel normal lainnya. Proses ini juga dibantu dengan adanya suatu enzim pemotong/pembelah Laminin5- γ 2 ini antara lain adalah *Matrix metalloproteinase* 2 (MMP2), MMP14, astacin dan mTLD. Aktivasi Enzim pembelah tersebut dapat dihambat dengan enzim inhibitor yakni TIMP. Namun pada sel kanker skuamosa (SCC), Dimana sel kanker tersebut telah mengaktivasi HRAS-V12 atau KRAS sehingga menyebabkan adanya transformasi control siklus sel. Hal ini menyebabkan adanya peningkatan invasi sel tumor dan overekspresi senyawa seperti laminin5- γ 2 serta protein lainnya yang berperan dalam pembelahan laminin5- γ 2 seperti grup MMPs, mTLD dan lainnya.

Ekspresi laminin5- γ 2 yang berlebihan ini dapat menyebabkan adanya stimulasi perkembangan sel kanker skuamosa terutama sel kanker serviks. Perkembangan ini ditandai dengan adanya peningkatan aktivitas sel dalam bermetastasis. Aktivitas ini meliputi invasi, adhesi dan migrasi sel kanker sehingga adanya penyebaran sel kanker dan mengganggu sel normal lainnya. Aktivitas migrasi sel kanker oleh laminin5- γ 2 diawali dengan mekanisme *Protein kinase C* (PKC) dan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Jalur ini diaktivasi pada saat terjadi penyembuhan luka dimana sel keratinosit berpindah (migrasi) pada area luka karena adanya keberadaan laminin-5 yang menempel pada area luka dengan cara *Focal adhesion* melalui pengikatan rantai dengan β 1 integrin.

Penempelan dengan integrin tersebut mengaktifasi enzim GTPase RHOA. Pada saat proses ini terjadi, sel keratinosit menukar penempelan tersebut sehingga aktivasi GTPase berubah menjadi aktivasi RAC1. Hal ini bisa terjadi karena adanya ligand laminin5 yang berikatan dengan permukaan sel keratinosit yakni integrin $\alpha 6\beta 4$. Migrasi yang terjadi dilihat berdasarkan aktivasi yang ditimbulkan dan rantai integrin yang terdesposisi dengan laminin5. Apabila migrasi sel melalui jalur aktivasi RHOA akan berhubungan dengan sel-sel dan migrasi tersebut termasuk dalam migrasi tidak terarah (non directional migration). Sedangkan migrasi sel melalui aktivasi RAC1 akan terjadi migrasi pada multi sheet epidermal dan migrasi tersebut memiliki arah (directional migration).

Adhesi pada sel kanker serviks terjadi sesaat setelah migrasi sel dilakukan. Proses ini berawal dengan adanya laminin5- $\gamma 2$ menempel pada reseptor sel $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 6\beta 4$. Kedua reseptor integrin ini memiliki fungsi yang berbeda. Fungsi Laminin5 dengan rantai $\alpha 3\beta 1$ disebut *Focal adhesions* yang mengatur adanya penempelan dan migrasi sel normal dan sel kanker. *Stable anchoring contacts* (SACs) merupakan fungsi dari laminin5 rantai $\alpha 6\beta 4$ dengan berinteraksi antara domain ekstraseluler dan endodomain dari $\beta 4$ integrin terhadap kollagen XVII dan plectin. *Focal adhesions* memiliki fungsi adhesi sel jangka pendek dan reversible pada kumpulan integrin, sedangkan SACs memiliki fungsi adhesi sel yang lebih stabil dan kompleks antara integrin – protein serta meningkatkan kemampuan dalam menghadapi tekanan luar sel dan resistensi gaya. Fungsi-fungsi tersebut merupakan fungsi normal pada sel, namun Hal itu teraktivasi secara berlebihan pada sel kanker (Marinkovich, M. Peter, 2007). Sehingga laminin5- $\gamma 2$ merupakan parameter penting dalam mendeteksi adanya

perkembangan sel kanker skuamosa (SCC) atau kanker serviks. (Skyldberg, Barbro *et al*,1999).

Pengujian laminin5- γ 2 pada sel HeLa dengan produk probiotik yakni Yogurt LBA-ST (*Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*) menggunakan metode imunositokimia. Kemudian hasil uji tersebut dikumpulkan dan dilakukan pengolahan data menggunakan SPSS. Proses pengolahan data diawali dengan uji normalitas saphiro-wilk Pertama, menggunakan uji normalitas menggunakan metode Saphiro-Wilk. Hasil uji distribusi data dikatakan normal apabila hasil signifikansi lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$). Dari hasil uji normalitas metode Saphiro-Wilk menunjukkan bahwa data terdistribusi secara normal dengan nilai $p=0,459$, $p=0,815$, $p=0,916$, $p=0,902$ (**Lampiran 4**). Semua data menunjukkan signifikansi lebih dari 0,05 ($p > 0,05$). Kemudian setelah data terdistribusi normal, dilanjutkan dengan uji Homogenitas. Data dikatakan homogen bila signifikansi lebih besar dari 0.05 ($p > 0.05$). Dari hasil bahwa data sudah homogen dengan $p=0,291$ ($p > 0,05$). (**Lampiran 4**)

Hasil Analisis Statistik One way Anova, menunjukkan hasil signifikansi $p=0,000$ ($p < 0,05$) (**Lampiran 4**). Hasil tersebut memiliki arti bahwa perlakuan pemberian supernatan yogurt LBA-ST memiliki perbedaan indeks ekspresi Laminin5- γ 2 yang signifikan antara kelompok perlakuan kontrol dan kelompok yang diberi perlakuan dosis supernatan yogurt. Hasil penelitian menunjukkan terjadinya penurunan indeks ekspresi Laminin5- γ 2 pada dosis 10,20, dan 40% bila dibandingkan dengan kontrol. Hasil Indeks ekspresi Laminin5- γ 2 pada dosis 40% v/v didapatkan terjadi penurunan indeks ekspresi Laminin5- γ 2 tertinggi (**Gambar 5.3**). Sehingga dari hasil tersebut menunjukkan kesimpulan bahwa terjadi penurunan jumlah sel line kanker serviks (HeLa cell) yang

mengekspresikan Laminin5- γ 2 setelah diberikan produk probiotik Supernatan Yogurt LBA-ST (*Lactobacillus Bulgaricus* dan *Streptococcus Thermophilus*) sehingga agen probiotik supernatan yogurt LBA-ST memiliki potensi dalam menghambat perkembangan sel kanker meliputi proses invasi, migrasi, dan adhesi yang berperan dalam proses metastaseserta menstimulasi apoptosis dan menghambat proliferasi sel kanker.

Agen probiotik Supernatan yogurt LBA-ST (*Lactobacillus Bulgaricus* dan *Streptococcus Thermophilus*) merupakan hasil sentrifugasi yogurt LBA-ST dengan memisahkan komponen lapisan atas yogurt dengan lapisan bawah. Hal ini bertujuan untuk mengambil kandungan SCFA pada yogurt yang memiliki masa jenis lebih ringan (short metbolit) dari kandungan lainnya, sehingga kandungan SCFA (metabolit rantai pendek) tersebut terkonsentrasi pada supernatan yogurt. Kandungan *Short Chain Fatty Acids* (SCFA) yang terdiri dari komponen asam lemah rantai pendek seperti butirrat, asetat, dan propionat dan bahan probiotik serta prebiotik. Metabolit tersebut yakni butirrat, asetat, dan propionate dapat memberikan efek antimutagenik, antioxidative, antikarsinogenik, dan memodulasi sistem imun (Wollowaaki et al, 2001). (Wollowaaki et al, 2001). El-Ghany et al (2009). Hasil penelitian Tan Jian et al dan Marks et al, Menjelaskan mekanisme SCFA sebagai antikanker dengan mengaktifasi proses cascade apoposis dan mengurangi pertumbuhan tumor melalui hiperasetilasi histon yang mungkin akan mengurangi resiko dari kanker. Dua mekanisme dalam signaling SCFA sebagai kemungkinan anti kanker, Mekanisme pertama dalam proses deasetilasi HDAC menggunakan regulasi ekspresi gen. Aktivitas Inhibitor intrinsik HDAC (HDACi) dimiliki oleh SCFA terutama butirrat dan propionat. Mekanisme kedua untuk menghasilkan efek

dari SCFA yaitu melalui signaling G-protein-coupled receptors (GPCRs). GPCRs yang dapat diaktivasi oleh SCFA yaitu GPR41, GPR43, and GPR109A (Jian Tan et.al,2014). SCFA dapat juga diajukan sebagai obat epigenetik atau inhibitor dari histone deacetylase (HDAC) inhibitors yang berperan penting dalam role antikanker secara biomolekuler dan memiliki efek antiproliferative terhadap sel tumor (Marks *et al*,2004;Acharya *et al*,2005)

Metabolit SCFA juga dapat menurunkan aktivitas enzim bakteri yang merespon terhadap konversi pro-karsinogen menjadi karsinogen serta dapat mengontrol keseimbangan microflora dalam organ vagina. Seperti pada kanker kolon (SCC) enzim bakteri β -glucuronidase dan meningkatkan aktivitas β -galactosidase and β -glucosidase activity sehingga bisa menegaskan efek prebiotik sebagai anti kanker (Raman *et al*,2013). Kemudian SCFA memodulasi system imun pro inflamasi seperti butirrat dapat menekan faktor transkripsi NF-kB di sel line HT-29, sedangkan asetat dapat meningkatkan produksi antibodi dan sel NK (Natural Killer) pada pasien kanker (Macfarlane et al. 2008). Hambatan proliferasi ini juga berakibat adanya hambatan ekspresi Laminin5- γ 2 dan enzim pembelah Laminin5 (MMPs, mTLD) sehingga metastasis sel kanker oleh Laminin5- γ 2 melalui proses invasi , adhesi dan migrasi akan menurun (Marinkovich ,M. Peter,2007).

Berdasarkan dengan hasil penelitian mengenai uji ekspresi Laminin5- γ 2 dan peran Laminin5- γ 2 yang penting dalam jalur invasi, migrasi, dan adhesi sel kanker sehingga memicu terjadinya proses metastasis kanker, maka supernatan yogurt *Lactobacillus Bulgaricus* dan *Streptococcus Thermophilus* menurunkan indeks ekspresi Laminin5- γ 2 yang signifikan pada dosis supernatan yogurt 40% v/v yang terdiri dari 400 μ L supernatan yogurt ditambah 600 μ L media kultur sel

HeLa. Hasil penelitian ini didapatkan keterbatasan yakni tidak dilakukan uji kuantitatif jumlah kandungan *Short Chain Fatty Acids* (SCFA) pada supernatant yogurt LBA-ST. Sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk aktivitas dan konsentrasi SCFA pada supernatant yogurt LBA-ST sebagai potensi terapi kanker serviks.

