

BAB IV HASIL PENELITIAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

4.1.1 Pengaruh Ekstrak Air Daun Sirsak, Doksorubisin, dan Tamoksifenterhadap Ekspresi Gen VEGF pada Kultur Sel Kanker T47D

Setelah dilakukan pengujian dengan variasi konsentrasi ekstrak air daun sirsak, IC₅₀ tamoksifen, dan IC₅₀ doksorubisin terhadap kultur sel T47D, selanjutnya dilakukan pengukuran ekspresi gen VEGF pada 6 kelompok uji menggunakan qRT-PCR. Data yang didapatkan dianalisis dengan metode kuantifikasi relatif metode *comparative threshold cycle analysis* atau perbandingan *delta delta threshold* karena belum ada kurva yang dapat dijadikan standar sehingga tidak digunakan perhitungan secara absolut. Metode ini membandingkan target dengan nilai referensi yang dipilih yaitu level ekspresi *housekeeping gene* yang sesuai, di mana pada penelitian ini menggunakan GAPDH. Agar nilai CT valid, efisiensi pada saat amplifikasi dari gen target harus sama dengan saat amplifikasi gen referensi dalam penelitian ini sama dengan 100%. Nilai yang diperoleh merupakan nilai perbandingan relatif terhadap kontrol menggunakan perhitungan berdasarkan rumus Livaks berikut:

$$\Delta CT_{eksperimen} = CT_{target\ pada\ eksperimen} - CT_{housekeeping\ gene\ pada\ eksperimen}$$

$$\Delta CT_{kontrol} = CT_{target\ pada\ kontrol} - CT_{housekeeping\ gene\ pada\ kontrol}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{kontrol} - \Delta CT_{eksperimen}$$

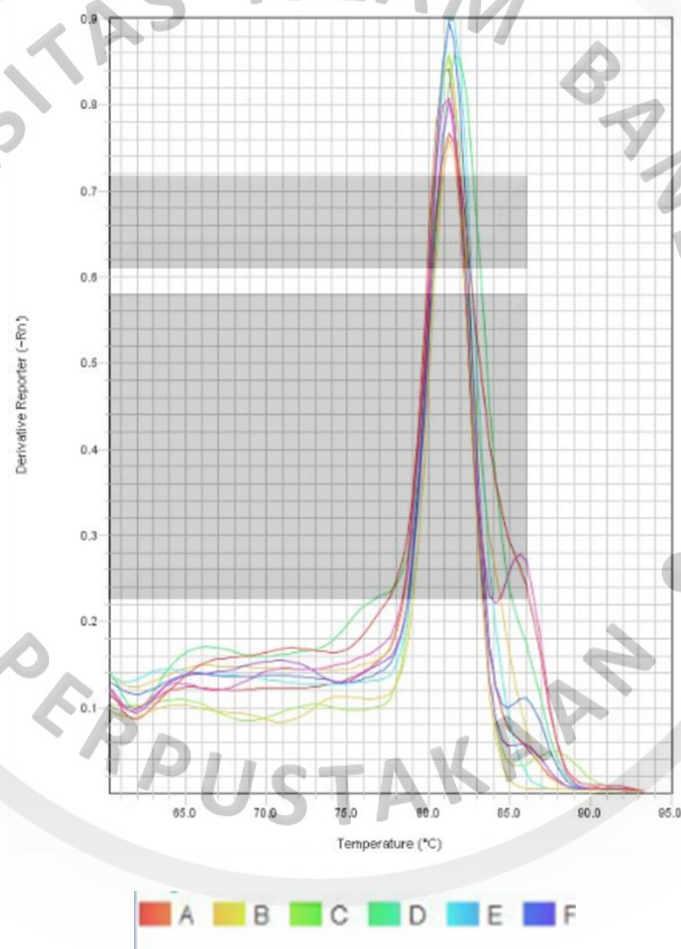
Perbandingan level ekspresi didapat dengan menggunakan persamaan:

$$\text{Perbandingan level ekspresi} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Pada penelitian ini perhitungan dilakukan menggunakan *software* 7500.

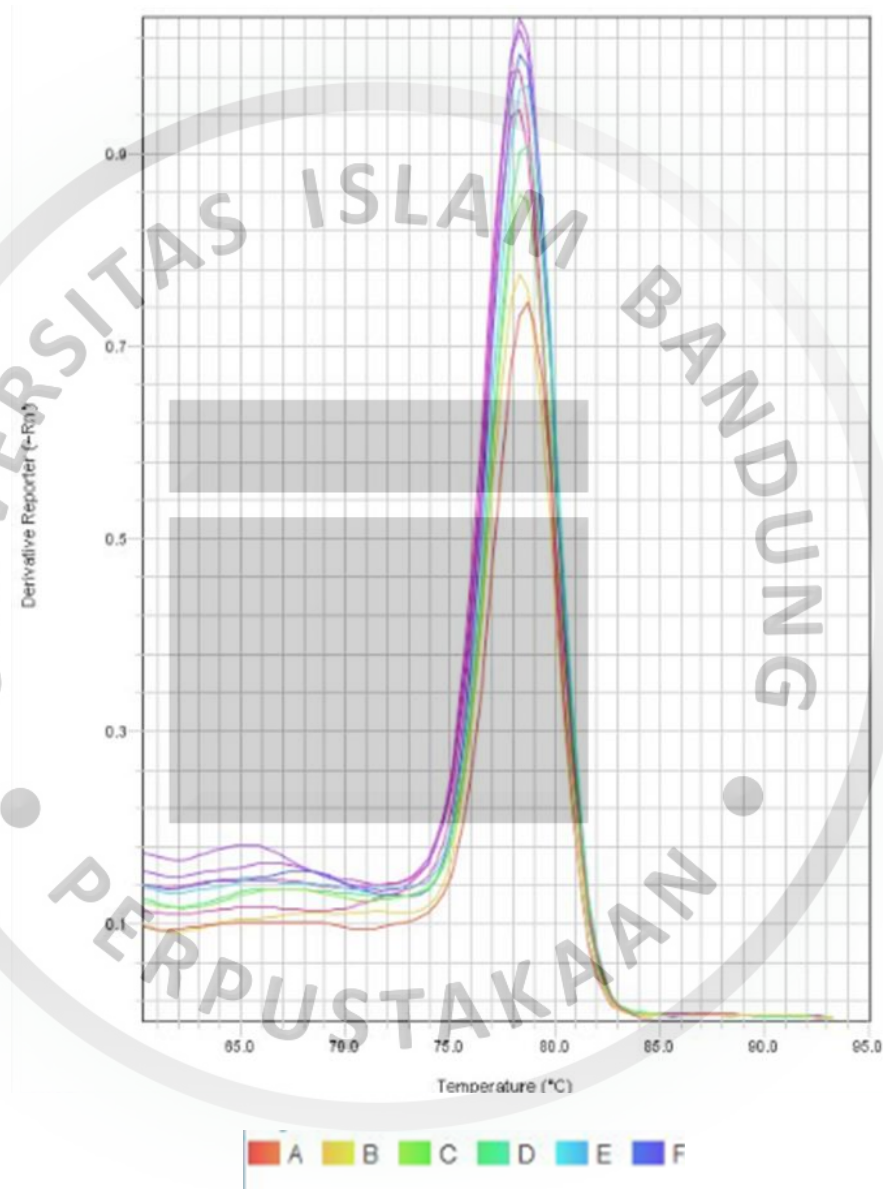
Untuk mendapatkan ekspresi gen VEGF yang optimal harus dilakukan optimasi.

Melting curve untuk GAPDH tersaji pada Gambar 4.1. Dari kurva ini terlihat hanya satu puncak, hal ini menunjukkan bahwa primer GAPDH didesain spesifik untuk gen GAPDH.

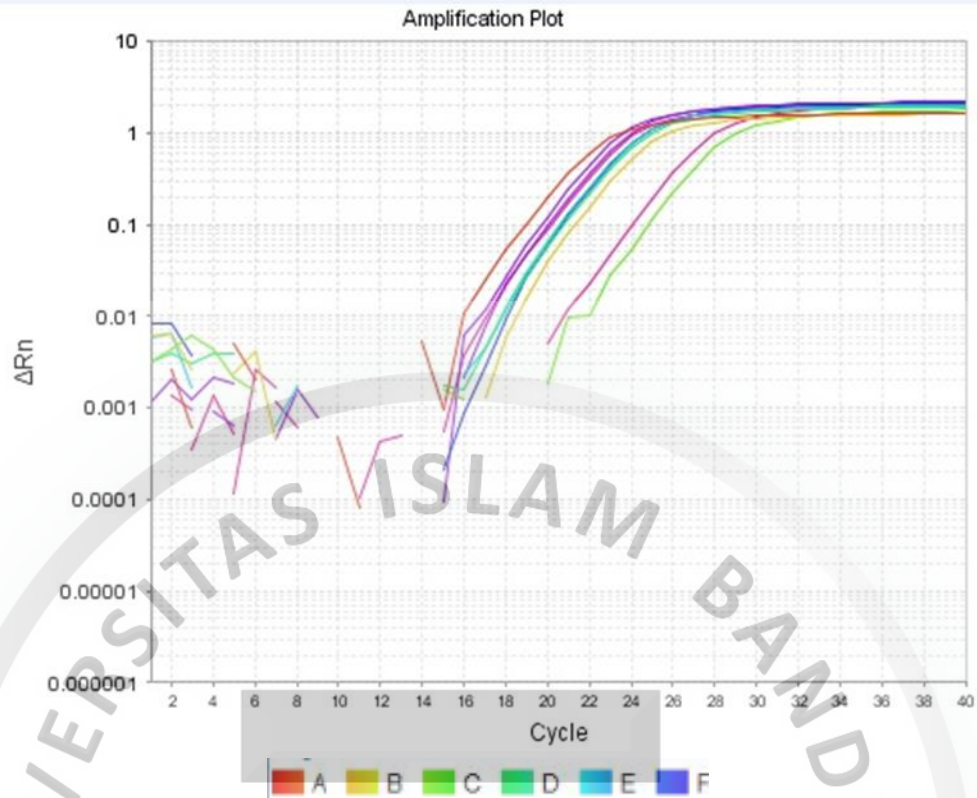


Gambar 4. 1 *Melting Curve* untuk GAPDH pada kelompok A (kelompok 1), B (kelompok 2), C (kelompok 3), D (kelompok 4), E (kelompok 5), dan F (kelompok 6)

Melting curve untuk gen VEGF tersaji pada Gambar 4.2. Dari kurva ini terlihat hanya satu puncak, dan hal ini menunjukkan bahwa primer telah didesain secara spesifik untuk VEGF. Adapun plot amplifikasi VEGF pada kelompok uji tersaji pada Gambar 4.3.



Gambar 4. 2 *Melting Curve* untuk VEGF pada kelompok A (kelompok 1), B (kelompok 2), C (kelompok 3), D (kelompok 4), E (kelompok 5), dan F (kelompok 6)



Gambar 4. 3 Grafik Plot Amplifikasi VEGF

Pengukuran dan analisis statistik ekspresi VEGF pada sel T47D tersaji pada Gambar 4.4. Uji normalitas dilakukan menggunakan uji kesesuaian *Shapiro-Wilk* dan hasil uji dengan $\alpha=5\%$ menunjukkan bahwa pada derajat kepercayaan 95%, tidak seluruh data terdistribusi normal. Karena data tidak terdistribusi normal, maka data disajikan dalam bentuk median, nilai maksimum, dan nilai minimum. Gambar 4.4 dan tabel 4.1 memperlihatkan median, nilai maksimum, dan nilai minimum ekspresi gen VEGF kelompok 2 (0,649; 0,77; 0,43), 3 (1,9160; 1,97; 1,65), 4 (0,9660; 1,07; 0,92), 5 (0,5600; 0,86; 0,56), dan 6 (0,1610; 0,18; 0,14).

Tabel 4. 1 Uji Normalitas

		Tests of Normality ^a					
		Kolmogorov-Smirnov ^b			Shapiro-Wilk		
	Kelompok	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
EksVEGF	2	.240	3	.	.974	3	.692
	3	.324	3	.	.876	3	.313
	4	.269	3	.	.949	3	.565
	5	.380	3	.	.762	3	.027
	6	.180	3	.	.999	3	.945

a. EksVEGF is constant when Kelompok = 1. It has been omitted.

b. Lilliefors Significance Correction

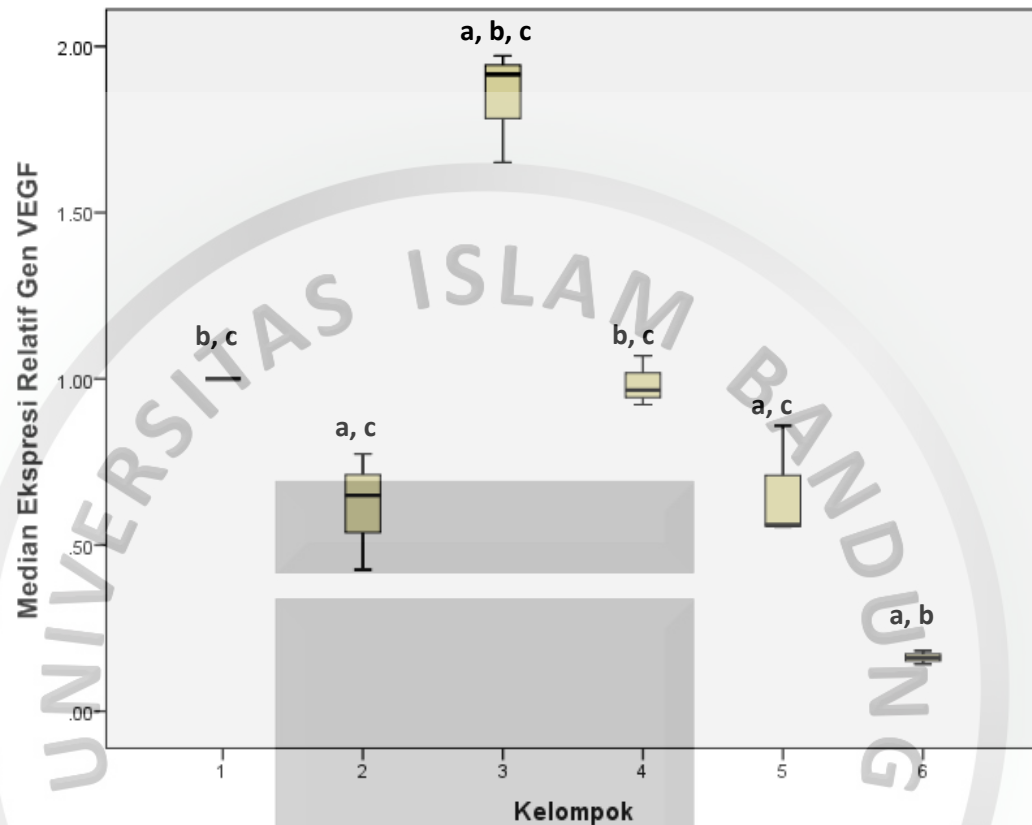
Tabel 4. 2 Median, Nilai Maksimum, dan Nilai Minimum Ekspresi gen VEGF Descriptives^a

	Kelompok		Statistic	Std. Error
EksVEGF	2	Mean	.6163	.10178
		95% Confidence Interval for Lower Bound	.1784	
		Mean Upper Bound	1.0542	
		5% Trimmed Mean	.	
		Median	.6490	
		Variance	.031	
		Std. Deviation	.17628	
		Minimum	.43	
		Maximum	.77	
		Range	.35	
		Interquartile Range	.	
		Skewness	-.805	1.225
		Kurtosis	.	.
			3	Mean
95% Confidence Interval for Lower Bound	1.4204			
Mean Upper Bound	2.2723			
5% Trimmed Mean	.			
Median	1.9160			
Variance	.029			
Std. Deviation	.17147			
Minimum	1.65			
Maximum	1.97			
Range	.32			
Interquartile Range	.			

	Skewness	-1.527	1.225
	Kurtosis	.	.
4	Mean	.9857	.04356
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	.7982
	Mean	Upper Bound	1.1731
	5% Trimmed Mean	.	.
	Median	.9660	.
	Variance	.006	.
	Std. Deviation	.07545	.
	Minimum	.92	.
	Maximum	1.07	.
	Range	.15	.
	Interquartile Range	.	.
	Skewness	1.093	1.225
	Kurtosis	.	.
5	Mean	.6580	.10051
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	.2255
	Mean	Upper Bound	1.0905
	5% Trimmed Mean	.	.
	Median	.5600	.
	Variance	.030	.
	Std. Deviation	.17409	.
	Minimum	.56	.
	Maximum	.86	.
	Range	.30	.
	Interquartile Range	.	.
	Skewness	1.730	1.225
	Kurtosis	.	.
6	Mean	.1617	.01155
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	.1120
	Mean	Upper Bound	.2114
	5% Trimmed Mean	.	.
	Median	.1610	.
	Variance	.000	.
	Std. Deviation	.02001	.
	Minimum	.14	.
	Maximum	.18	.
	Range	.04	.
	Interquartile Range	.	.

Skewness	.150	1.225
Kurtosis	.	.

a. EksVEGF is constant when Kelompok = 1. It has been omitted.



Gambar 4.4 Grafik Perbedaan Ekspresi VEGF pada Kultur Sel T47D

Keterangan:

Kelompok 1: Kelompok tanpa perlakuan

Kelompok 2: Kelompok T47D yang diberi ekstrak sirsak $\frac{1}{2}$ IC₅₀

Kelompok 3: Kelompok T47D yang diberi ekstrak sirsak IC₅₀

Kelompok 4: Kelompok T47D yang diberi ekstrak sirsak 2 IC₅₀

Kelompok 5: Kelompok T47D yang diberi doksorubisin IC₅₀

Kelompok 6: Kelompok T47D yang diberi tamoksifen IC₅₀

Uji *Post Hoc* menggunakan *Mann Whitney*

- a= kelompok yang berbeda bermakna dengan kelompok 1
- b= kelompok yang berbeda bermakna dengan kelompok 5
- c= kelompok yang berbeda bermakna dengan kelompok 6

Tabel 4. 3 Oneway Annova

ANOVA					
EksVEGF					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.782	5	.956	59.240	.000
Within Groups	.194	12	.016		
Total	4.976	17			

Tabel 4. 4 Mann Whitney Test Kelompok 1 dan 2

Test Statistics ^a		EksVEGF
Mann-Whitney U		.000
Wilcoxon W		6.000
Z		-2.087
Asymp. Sig. (2-tailed)		.037
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.100 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

Tabel 4. 5 Mann Whitney Test Kelompok 1 dan 3

Test Statistics ^a		EksVEGF
Mann-Whitney U		.000
Wilcoxon W		6.000
Z		-2.087
Asymp. Sig. (2-tailed)		.037
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.100 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

Tabel 4. 6 Mann Whitney Test Kelompok 1 dan 4

Test Statistics ^a		EksVEGF
Mann-Whitney U		3.000
Wilcoxon W		9.000
Z		-.696
Asymp. Sig. (2-tailed)		.487

Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^b
--------------------------------	-------------------

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

**Tabel 4. 7 Mann Whitney Test Kelompok 1 dan 5
Test Statistics^a**

	EksVEGF
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-2.087
Asymp. Sig. (2-tailed)	.037
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

**Tabel 4. 8 Mann Whitney Test Kelompok 1 dan 6
Test Statistics^a**

	EksVEGF
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-2.087
Asymp. Sig. (2-tailed)	.037
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

**Tabel 4. 9 Mann Whitney Test Kelompok 5 dan 2
Test Statistics^a**

	EksVEGF
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-.218
Asymp. Sig. (2-tailed)	.827
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

**Tabel 4. 10 Mann Whitney Test Kelompok 5 dan 3
Test Statistics^a**

	EksVEGF
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

**Tabel 4. 11 Mann Whitney Test Kelompok 5 dan 4
Test Statistics^a**

	EksVEGF
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

**Tabel 4. 12 Mann Whitney Test Kelompok 5 dan 6
Test Statistics^a**

	EksVEGF
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

**Tabel 4. 13 Mann Whitney Test Kelompok 6 dan 2
Test Statistics^a**

	EksVEGF
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

**Tabel 4. 14 Mann Whitney Test Kelompok 6 dan 3
Test Statistics^a**

	EksVEGF
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

**Tabel 4. 15 Mann Whitney Test Kelompok 6 dan 4
Test Statistics^a**

	EksVEGF
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

4.2 Pembahasan

Kanker payudara merupakan kanker yang paling umum pada wanita di seluruh dunia. Di Indonesia, kanker payudara menjadi kanker penyebab kematian ke dua.⁴³

Gen VEGF merupakan salah satu faktor proangiogenik yang paling penting karena kemampuan VEGF untuk secara langsung menargetkan sel-sel tumor yang berkontribusi pada inisiasi tumor, perkembangan, dan kekambuhan sel tumor.^{14,44} Telah terbukti secara signifikan bahwa VEGF terlibat dalam meningkatkan pertumbuhan tumor dan metastasis melalui stimulasi angiogenesis. Oleh karena itu, menghambat aktivitas VEGF dapat menyebabkan sel tumor kekurangan suplai nutrisi sehingga akan menghambat pertumbuhan sel tumor.

Pada penelitian ini didapatkan ekspresi gen VEGF pada kelompok yang diberi terapi ekstrak air daun sirsak konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC50 lebih rendah secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p=0,037$). Data ini menunjukkan bahwa ekstrak air daun sirsak dapat menurunkan ekspresi gen VEGF. Hasil ini sama dengan penelitian terdahulu, yang menyatakan terjadi penurunan ekspresi VEGF pada beberapa jenis kanker.⁴⁴

Mekanisme ini dapat dimungkinkan karena flavonoid dan AGEs pada ekstrak air daun sirsak dapat menghambat proses angiogenesis dengan cara menurunkan ekspresi gen VEGF. Hal ini juga sejalan dengan penelitian sebelumnya dengan metode *docking molecular* yang menyatakan bahwa *15-acetyl guanacone* menargetkan dan mengikat VEGF2 sehingga mortalitas dan morbiditas sel kanker akan mengalami peningkatan karena pasokan nutrisi terhenti

Menurut penelitian terdahulu, fungsi VEGF pada kanker tidak hanya terbatas pada angiogenesis atau permeabilitas pembuluh darah karena sinyal yang dimediasi oleh VEGF juga berkontribusi pada tumorigenesis, termasuk fungsi sel punca kanker dan inisiasi tumor.^{40, 44} Penghambatan pembentukan jaringan pembuluh darah baru yang digunakan oleh sel-sel tumor dapat dilakukan dengan mensupresi nutrisi koloni baru dan dengan demikian akan menghambat invasi ke jaringan sekitarnya. Pada kanker payudara, penurunan ekspresi VEGF akan menghambat pertumbuhan tumor baik pada uji *in vitro* dan *in vivo* serta mereduksi metastasis ke jaringan sekitar⁴⁵

Gambar 4.4 menunjukkan ekspresi gen VEGF pada kelompok yang diberi terapi ekstrak air daun sirsak konsentrasi IC_{50} dan $2IC_{50}$ lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan kelompok yang diberi IC_{50} doksorubisin ($p=0,050$). Data ini menunjukkan bahwa doksorubisin dapat menurunkan ekspresi gen VEGF lebih baik daripada ekstrak air daun sirsak. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang menunjukkan bahwa doksorubisin memiliki efek menghambat proses angiogenesis dan induksi apoptosis sel endotel yang kemungkinan merupakan mekanisme penting untuk aktivitas antikanker.⁴⁶ Doksorubisin adalah obat kemoterapi antrasiklin yang efektif dalam mengobati berbagai malignansi.⁴⁷ Doksorubisin memiliki efek sitotoksik yang dapat menghentikan fraksi sel tumor sehingga dapat menghambat pertumbuhan sel tumor.⁴⁸

Gambar 4.4 menunjukkan bahwa ekspresi gen VEGF pada kelompok yang diberi terapi ekstrak air daun sirsak konsentrasi $\frac{1}{2}IC_{50}$, IC_{50} , dan $2IC_{50}$ lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan kelompok yang diberi IC_{50} doksorubisin

($p=0,050$). Data ini menunjukkan bahwa tamoksifen dapat menurunkan ekspresi gen VEGF lebih baik daripada ekstrak air daun sirsak. Hal serupa sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menilai bahwa pengobatan pada sel tumor MCF-7 dengan tamoksifen menghasilkan penurunan 68% dalam jumlah pembuluh di pinggiran tumor. Efek anti-angiogenik yang dimiliki oleh tamoksifen kemungkinan dihasilkan dari peningkatan ekspresi gen yang diinduksi IFN.^{49, 50} Tamoksifen direkomendasikan sebagai terapi standar kanker payudara.⁵¹ Tamoksifen sudah banyak digunakan untuk pengobatan dan pencegahan kekambuhan untuk pasien-pasien dengan kanker payudara positif *estrogen receptor* (ER). Manfaat obat ini untuk pengobatan kanker payudara ini terbukti dengan penurunan tingkat kekambuhan dan mortalitas.⁵²

Setelah dilakukan analisis pada ekspresi gen VEGF pada kultur sel T47D, didapatkan ekstrak air daun sirsak dengan konsentrasi $\frac{1}{2}IC_{50}$ dapat menurunkan ekspresi gen VEGF setara dengan IC_{50} doksorubisin. Namun tamoksifen lebih efektif dalam menurunkan ekspresi gen VEGF daripada ekstrak air daun sirsak.

4.3 Keterbatasan Penelitian

Pada penelitian ini, pengujian dilakukan dengan menggunakan ekstrak air daun sirsak, bukan dengan zat aktif murni yang diisolasi dari ekstrak air daun sirsak. Sehingga peneliti tidak mengetahui zat aktif mana yang berperan sebagai antikanker. Selain itu, pengujian dilakukan hanya pada satu tipe sel, yaitu sel T47D.