

TESIS

**EKSPRESI TGF- β DAN VEGF-A
PADA JARINGAN KANKER PAYUDARA TIKUS
Sprague dawley YANG DIBERIKAN EKSTRAK
ETANOL DAUN *Annona muricata***

Penelitian Eksperimental Laboratorium



Oleh:

Azarya Angelina Ibrahim

NIM 091714353012

**PROGRAM STUDI MAGISTER
IMUNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

TESIS

**EKSPRESI TGF- β DAN VEGF-A
PADA JARINGAN KANKER PAYUDARA TIKUS
Sprague dawley YANG DIBERIKAN EKSTRAK
ETANOL DAUN *Annona muricata***

Oleh:

Azarya Angelina Ibrahim

NIM. 091714353012

**PROGRAM STUDI MAGISTER
IMUNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

**EKSPRESI TGF- β DAN VEGF-A
PADA JARINGAN KANKER PAYUDARA TIKUS
Sprague dawley YANG DIBERIKAN EKSTRAK
ETANOL DAUN *Annona muricata***

Penelitian Eksperimental Laboratorium

Tesis

**Untuk Memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Imunologi Pada
Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh:

**Azarya Angelina Ibrahim
NIM. 091714353012**

**PROGRAM STUDI MAGISTER
IMUNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

TESIS INI TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL:
10 Februari 2020

Oleh:

Pembimbing Ketua



Dr. Willy Sandhika, dr., M.Si., Sp. PA(K)
NIP. 19640314 199002 1 001

Pembimbing Kedua



Dr. Vicky Sumarki Budipramana, dr., Sp. B-KBD
NIP. 19550911 198201 1 001

Mengetahui,
Koordinator Program Studi Magister Imunologi



Dr. Theresia Indah Budhy S., drg., M.Kes.
NIP. 19610607 198703 2 005

Telah diuji pada

Tanggal : 28 Januari 2020

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr. Theresia Indah Budhy S., drg., M.Kes.

Anggota : 1. Dr. Willy Sandhika, dr., M.Si., Sp. PA(K)
2. Dr. Vicky Sumarki Budipramana, dr., Sp. B-KBD
3. Dr. Budi Utomo, dr., M.Kes
4. Dra. Heny Arwati, M.Sc., Ph.D.

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Azarya Angelina Ibrahim

NIM : 091714353012

Program Studi : Magister Immunologi

Judu Tesis : Ekspresi TGF- β dan VEGF-A pada Jaringan Kanker Payudara Tikus *Sprague dawley* yang Diberikan Ekstrak Etanol Daun *Annona muricata*

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tesis saya ini adalah asli (hasil karya sendiri) bukan merupakan hasil peniruan atau penjiplakan (Plagiarism) dari karya orang lain. Tesis ini belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik.

Dalam tesis ini tidak terdapat pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar pustaka. Demikian pernyataan ini dibuat tanpa adanya paksaan dari pihak manapun. Apabila pernyataan ini tidak benar, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan norma dan peraturan yang berlaku di Universitas Airlangga

Surabaya, 23 Januari 2020



Azarya Angelina Ibrahim
NIM. 091714353012

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur Kehadirat Tuhan atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan tesis dengan judul EKSPRESI TGF- β DAN VEGF-A PADA JARINGAN KANKER PAYUDARA TIKUS *Sprague dawley* YANG DIBERIKAN EKSTRAK ETANOL DAUN *Annona muricata*

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Willy Sandhika, dr., M.Si., Sp. PA(K) selaku Pembimbing Ketua dan Dr. Vicky Sumarki Budipramana, dr., Sp. B-KBD selaku Pembimbing atas saran dan bimbingannya.
2. Dr. Theresia Indah Budhy S., drg., M.Kes., selaku Kepala Prodi Magister Imunologi serta Dr. Budi Utomo, dr., M.Kes., dan Dra. Heny Arwati, M.Sc., Ph.D. selaku anggota penguji
3. Seluruh staf pengajar Magister Imunologi Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan Magister.
4. Alm. Ayahanda Johnny Ibrahim dan Ibunda yang selalu setia mendukung dan memberi semangat serta doa hingga tesis dapat diselesaikan.
5. Tante Titie dan Pak Budi Santoso yang selalu memberi dukungan baik secara moral dan materiil.
6. Aniruddha Nandi yang sabar dan selalu memberi semangat

Surabaya, 23 Januari 2020

Azaarya Angelina Ibrahim

RINGKASAN

**EKSPRESI TGF- β DAN VEGF-A PADA JARINGAN KANKER
PAYUDARA TIKUS *SPRAGUE DAWLEY* YANG DIBERIKAN EKSTRAK
ETANOL DAUN *ANNONA MURICATA***

Azarya Angelina Ibrahim

Ancaman kanker di Indonesia semakin meningkat seiring dengan perubahan pola hidup masyarakat. Saat ini salah satu jenis kanker yaitu kanker payudara menjadi salah satu jenis kanker yang sangat menakutkan bagi perempuan di seluruh dunia termasuk Indonesia. Kanker payudara adalah tumor ganas yang terbentuk dari sel-sel payudara yang tumbuh dan berkembang tanpa terkendali sehingga dapat menyebar ke jaringan atau organ yang berada dekat dengan payudara atau ke bagian tubuh lainnya. Diperkirakan sebanyak 1.384.155 terjadi kasus baru di seluruh dunia dengan angka kematian sekitar 459.000 (Tao *et al.*, 2015).

Dengan kemajuan teknologi dalam bidang kesehatan, banyak tanaman obat-obatan yang dijadikan sebagai objek penelitian dimana kandungan metabolit/bioaktif sekundernya berpotensi menjadi antikanker salah satunya adalah daun sirsak. *Annona muricata* Linn atau Graviola yang merupakan anggota *family Annonaceae* telah digunakan sebagai obat tradisional untuk menangani berbagai jenis penyakit seperti demam, rematik, kanker dan juga sebagai sedatif, insektisida dan immunosupresif. *Annonaceous acetogenins* (AA) merupakan metabolit sekunder yang diproduksi dari famili Annonaceae. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Syed Najmuddin *et al* (2016), ekstrak *Annona muricata* memiliki efek anti-proliferasi terhadap kanker payudara *cell line* MCF-7, MDA-MB-231 dan 4 T1 *cells*. Ekstrak daun sirsak ini juga menginduksi apoptosis pada sel kanker 4 T1 dan menghambat pertumbuhan tumor *in vivo*.

Untuk melihat progresivitas sel kanker dapat dilihat melalui ekspresi *Transforming growth factor* (TGF- β) dan *VEGF-A*. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa TGF- β dapat berubah menjadi tumor promoter melalui proses infiltrasi tumor epitelial yang sering disebabkan oleh *epithelial-to-mesenchymal transition* (EMT), *downregulation* adesi molekul sel, peningkatan ekspresi metalloprotease dan peningkatan motilitas serta angiogenesis dimana seluruh hal tersebut dapat dimodulasi oleh TGF- β (Dumont dan Arteaga, 2000). VEGF merupakan salah satu faktor angiogenik yang poten dan memainkan peran penting dalam pertumbuhan tumor dan metastasis. VEGF meregulasi sebagian besar proses pada kanker payudara. Sekitar 72 – 98% kanker payudara positif VEGF melalui imunohistokimia. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa semakin banyak ekspresi VEGF-A maka semakin jelek prognosis kanker payudara.

Pada penelitian ini peneliti menggunakan 3 kelompok hewan coba yaitu kelompok hewan coba yang diinduksi dengan DMBA tanpa pemberian perlakuan (K0), kelompok perlakuan 1 yaitu kelompok hewan coba yang diinduksi dengan

DMBA dan diberi ekstrak etanol daun *A. muricata* dengan dosis 300 mg/kgBB dan kelompok perlakuan 2 (KP2) yaitu kelompok hewan coba yang diinduksi dengan DMBA dan diberi ekstrak etanol daun *A. muricata* dengan dosis 600 mg/kgBB. Bahan yang digunakan untuk menginduksi kanker payudara adalah DMBA yang dilarutkan dalam minyak jagung dengan dosis 20 mg/kgBB selama 10 minggu. Dari 42 ekor yang diinduksi, hasil induksi DMBA adalah sebanyak 20 ekor mengalami kanker, dimana 18 ekor terbentuk nodul di payudaranya dan 2 ekor tikus terbentuk di pipi. Adapun hasil yang diperoleh K0 (tanpa perlakuan) sebanyak 6 ekor, KP1 sebanyak 5 ekor dan KP2 sebanyak 2 ekor.

Berdasarkan uji statistik Kruskal-Wallis yang diperoleh hasil sel kanker yang mengekspresikan VEGF-A antara kelompok kontrol dan perlakuan terdapat perbedaan signifikan dimana rata-rata pada kelompok perlakuan lebih tinggi dari pada kelompok kontrol. Uji Mann-Whitney dilakukan untuk melihat pengaruh ekstrak antar kelompok. Hasilnya adalah terdapat perbedaan signifikan pada kelompok kontrol dan kelompok dosis 300 mg/kgBB (KP1) dan kelompok kontrol dengan kelompok dosis 600 mg/kgBB (KP2). Tidak terdapat perbedaan signifikan pada kelompok dosis 300 mg/kgBB dan 600 mg/kgB. Peningkatan level faktor angiogenik seperti VEGF pada beberapa jenis kanker yang berbeda menunjukkan keagresifan kanker yang mengindikasikan resiko tinggi dan prognosis yang buruk. Peningkatan ekspresi VEGF juga berhubungan dengan respon pengobatan sistemik yang buruk dan radioterapi. Penggunaan agen anti-angiogenik menyebabkan lingkungan tumor yang hipoksik sehingga menyebabkan tumor menjadi lebih invasif dan penyebaran metastase, kemungkinan melalui stimulasi *stem cell* kanker melalui HIF. Peningkatan HIF akan menyebabkan peningkatan produksi VEGF oleh sel kanker. VEGF akan berikatan dengan reseptornya yaitu VEGFR pada permukaan sel endotel. Hal ini akan menyebabkan inisiasi pertumbuhan sel endotel baru yang akan bermigrasi menuju matriks ekstraseluler untuk membentuk pembuluh darah baru.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat tidak terdapat perbedaan yang signifikan dalam ekspresi TGF- β pada sel kanker payudara tikus. Hal ini berarti bahwa dengan atau tidak ada pemberian ekstrak daun *A. muricata* pada tikus tidak mempengaruhi ekspresi TGF- β pada sel kanker payudara tikus. Pada saat sel tumor memasuki fase pertumbuhan yang tidak terkendali, sebagian besar TGF- β kehilangan sensitivitasnya dalam fungsi *tumor-suppressor*. Fenomena ini terjadi meskipun terdapat reseptor TGF- β pada membran sel tumor. Sel kanker akan memulai untuk mensekresi TGF- β . Kondisi ini akan mempengaruhi lingkungan di sekitar kanker, yang pada akhirnya akan menyebabkan hipoksia di sekitar kanker. TGF- β juga dapat berperan dalam proses angiogenesis secara tidak langsung dengan cara mendatangkan mediator inflamasi yang dapat mensekresi faktor angiogenik seperti makrofag yang kemudian akan mensekresi VEGF. Pemberian agen anti-angiogenesis pada kanker akan menyebabkan lingkungan mikrotumor yang hipoksik. TGF- β menstabilisasi HIF- α kemudian memediasi jalur persinyalan TGF- β . Aktivasi TGF- β akan menurunkan ekspresi *prolyl hydroxylase 2* (PHD2) melalui jalur *Smad-dependent* yang akan menyebabkan akumulasi HIF- α dan selanjutnya terjadi proses EMT sehingga kanker terus berkembang dan akhirnya bermetastasis

Hasil penelitian menunjukkan terdapat hubungan kuat antara ekspresi TGF- β dan VEGF-A pada tikus model kanker payudara ($r=0,676$). Ekspresi TGF- β lebih rendah dari VEGF-A yang berarti bahwa semakin rendah ekspresi TGF- β maka semakin tinggi ekspresi VEGF-A. Persinyalan TGF- β dapat menekan pembentukan tumor dan metastasis melalui berbagai mekanisme, termasuk inhibisi proliferasi sel dan induksi apoptosis. Keterbatasan dalam lingkungan kanker sangat umum pada kanker, diperlukan suatu mekanisme yang dapat meningkatkan angiogenesis untuk menyediakan nutrisi dan oksigen bagi sel kanker. *Signaling* TGF- β dapat menghambat ekspresi VEGF-A dan sebagai konsekuensinya angiogenesis terhambat. Sebaliknya, penurunan ekspresi TGF- β akan meningkatkan ekspresi VEGF-A dan angiogenesis terus berlanjut. Regulasi VEGF-A oleh TGF- β terjadi pada tahap post-transkripsional sedangkan regulasi VEGF-A oleh HIF-1 α terjadi pada fase transkripsi. TGF- β menurunkan stabilitas protein VEGF-A melalui ubiquinisasi dan degradasi

SUMMARY

EXPRESSION OF TGF- β AND VEGF-A IN THE *SPRAGUE DAWLEY* RAT BREAST CANCER TISSUE TREATED WITH ETHANOL EXTRACT OF *ANNONA MURICATA* LEAVES

Azarya Angelina Ibrahim

The threat of cancer in Indonesia is increasing along with changes in people's lifestyles. Currently, one type of cancer, breast cancer, is one type of cancer that is very frightening for women around the world, including Indonesia. Breast cancer is a malignant tumor that is formed from breast cells that grow and develop uncontrollably so that it can spread to tissues or organs that are close to the breast or to other body parts. An estimated 1,384,155 new cases occur worldwide with a mortality rate of around 459,000.

With technological advances in the health sector, many medicinal plants are used as research objects where the secondary metabolite / bioactive content has the potential to be an anticancer one of which is soursop leaves. *Annona muricata* Linn or Graviola which is a member of the Annonaceae family has been used as traditional medicine to treat various types of diseases such as fever, rheumatism, cancer and also as sedatives, insecticides and immunosuppressives. Annonaceous acetogenins (AA) is a secondary metabolite produced from the Annonaceae family. According to research conducted by Syed Najmuddin et al (2016), *Annona muricata* extract has an anti-proliferative effect on MCF-7, MDA-MB-231 and 4 T1 cells. Soursop leaf extract also induces apoptosis in 4 T1 cancer cells and inhibits tumor growth in vivo.

To see the progression of cancer cells can be seen through the expression of Transforming growth factor (TGF- β) and Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A). Several studies have shown that TGF- β can turn into a tumor promoter through the process of epithelial tumor infiltration which is often caused by epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), downregulation of cell molecular adhesion, increased expression of metalloproteases and increased motility and angiogenesis where all of these can be modulated by TGF- β (Dumont and Arteaga, 2000). VEGF is one of the potential angiogenic factors and plays an important role in tumor growth and metastasis. VEGF regulates most of the processes in breast cancer. About 72-98% of VEGF positive breast cancers go through immunohistochemistry. Several studies have shown that the more VEGF-A expression, the worse the prognosis of breast cancer.

In this study, researchers used 3 groups of experimental animals namely groups of animals induced with DMBA without treatment (K0), treatment group 1 namely groups of animals induced by DMBA and given ethanol extract of *A. muricata* leaves at a dose of 300 mg/kg and treatment group 2 (KP2) is a group of experimental animals induced by DMBA and given ethanol extract of *A. muricata* leaves at a dose of 600 mg/kg. The material used to induce breast cancer is DMBA dissolved in corn oil at a dose of 20 mg/kg for 10 weeks. Of the 42 induced rats, the result of induction of DMBA was 20 of them had cancer, in

which 18 nodules formed in their breasts and 2 mice formed on the cheeks. The results obtained by K0 (without treatment) were 6 rats, KP1 was 5 rats and KP2 was rats.

Based on the Kruskal-Wallis statistical test the results obtained by VEGF-A cancer cells between the control and treatment groups contained a significant difference where the average in the treatment group was higher in the control group. Mann-Whitney test was performed to see the effect of extracts between groups. It was significant in the control group and the dose group 300 mg/kg (KP1) and the control group at a dose of 600 mg/kg (KP2). There were no significant differences in the dose groups 300 mg/kg and 600 mg/kg. Increased levels of angiogenic factors such as VEGF in several different types of cancer indicate cancer aggressiveness that indicates a high risk and poor prognosis. Besides increasing VEGF is also associated with poor systemic treatment response and radiotherapy. The use of anti-angiogenic agents causes hypoxic environmental tumors to cause tumors to become more invasive and spread of metastases, using stimulation of cancer stem cells through HIF. Increased HIF will cause an increase in VEGF production by cancer cells. VEGF binds to its receptor, VEGFR, on the surface of endothelial cells. This will cause the growth of new endothelial cells that will migrate towards the extracellular matrix to form new blood vessels.

The results showed that there was no significant difference in TGF- β expression in rat breast cancer cells. This means that the presence or absence of *A. muricata* leaf extract in mice does not affect TGF- β expression in rat breast cancer cells. When tumor cells enter an uncontrolled growth phase, most TGF- β loses its sensitivity in tumor-suppressor function. This phenomenon occurs despite TGF- β receptors on tumor cell membranes. In addition, cancer cells will begin to secrete TGF- β . This condition will affect the environment around cancer, which in turn will cause hypoxia around the cancer. TGF- β can also play a role in the process of angiogenesis indirectly by bringing in inflammatory mediators that can secrete angiogenic factors such as macrophages which then secrete VEGF. Provision of anti-angiogenesis agents in cancer will cause a hypoxic microtumor environment. TGF- β stabilizes HIF- α then mediates TGF- β signaling pathways. TGF- β activation will reduce the expression of prolyl hydroxylase 2 (PHD2) through the Smad-dependent pathway which will cause the accumulation of HIF- α and the subsequent EMT process so that the cancer continues to develop and eventually metastasize.

The results showed there was a strong significant relationship between TGF- β expression and VEGF-A expression in mice with breast cancer models ($r=0,676$). TGF- β expression is lower than VEGF-A which means that the lower the TGF- β expression, the higher the VEGF-A expression. TGF- β signaling can suppress tumor formation and metastasis through various mechanisms, including inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis. Limitations in the cancer environment are very common in cancer, a mechanism that can increase angiogenesis to provide nutrients and oxygen for cancer cells is needed. TGF- β signaling can inhibit VEGF-A expression and as a consequence angiogenesis is inhibited. Conversely, decreased TGF- β expression will increase VEGF-A

expression and angiogenesis continues. The regulation of VEGF-A by TGF- β occurs in the post-transcriptional stage while the regulation of VEGF-A by HIF-1 α occurs in the transcription phase. TGF- β decreases the stability of the VEGF-A protein through ubiquitination and degradation