

EFEK ANTIANGIOGENIK ALKALOID FRAKSI KLOROFORM
BUAH MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.)
PADA MEMBRAN KORIO ALANTOIS (CAM)
EMBRIO AYAM YANG TERINDUKSI bFGF

SKRIPSI



Oleh :

ASHADI

02 613 135

JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
JUNI 2006

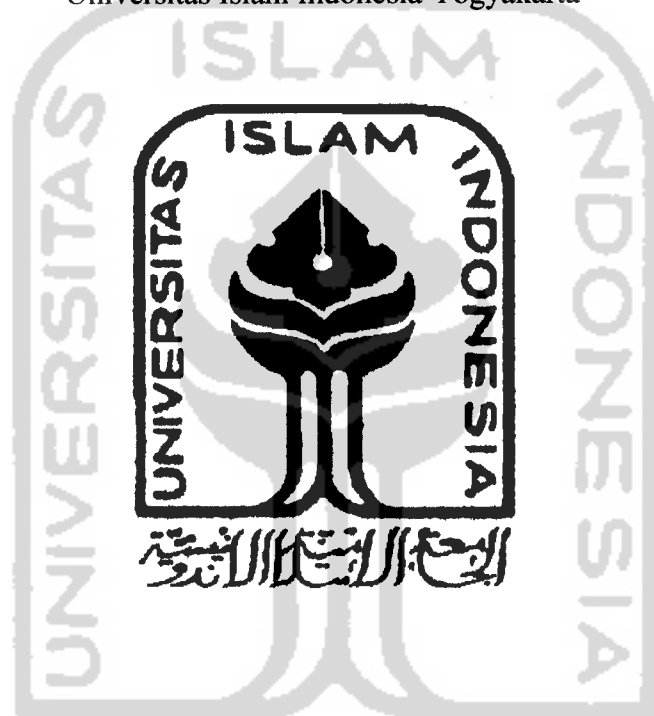
**EFEK ANTIANGIOGENIK ALKALOID FRAKSI KLOOROFORM
BUAH MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.)
PADA MEMBRAN KORIO ALANTOIS (CAM)
EMBRIO AYAM YANG TERINDUKSI bFGF**

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi
(S.Farm.)

Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia Yogyakarta



Oleh :

A S H A D I

02 613 135

**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
JUNI 2006**

SKRIPSI

EFEK ANTIANGIOGENIK ALKALOID FRAKSI KLOROFORM
BUAH MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.)
PADA MEMBRAN KORIO ALANTOIS (CAM)
EMBRIO AYAM YANG TERINDUKSI bFGF



Yang diajukan oleh

ASHADI

02 613 135

Telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

drh. Retno Murwanti, MP

Asih Triastuti, SF., Apt

SKRIPSI

EFEK ANTIANGIOGENIK ALKALOID FRAKSI KLOROFORM
BUAH MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.)
PADA MEMBRAN KORIO ALANTOIS (CAM)
EMBRIO AYAM YANG TERINDUKSI bFGF

Oleh :

A S H A D I
02 613 135

Telah dipertahankan dihadapan Panitia Penguji Skripsi
Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Tanggal : 22 Juni 2006

Ketua penguji,



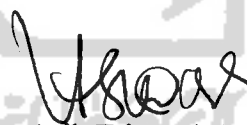
drh. Retno Murwanti, MP

Anggota penguji,



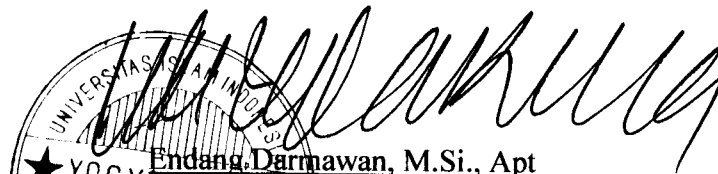
Endang Darmawan, M.Si., Apt

Anggota penguji,




Asih Triastuti, SF., Apt

Mengetahui
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia



Endang Darmawan, M.Si., Apt



PERNYATAAN

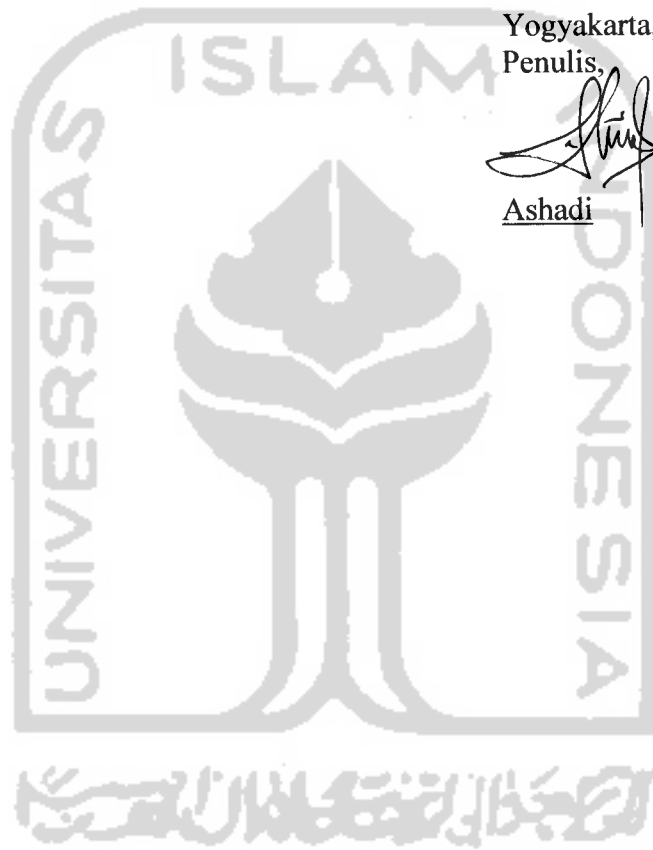
Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan disuatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya, juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 22 Juni 2006

Penulis,



Ashadi



*Kupersembahkan Untuk Abah dan Mama Tersayang
yang Selalu Memberikan Kasih Sayang dan Doa,
Kak Adi dan Dedi yang Selalu Memberi Semangat,
Guru dan Orang-Orang yang Telah Mencerahkan Ilmunya,
Sahabat-Sahabatku yang Selalu Setia Mendukung
Tulang Rusukku Dimanapun Kau Berada
Setiap Orang yang Mengenal dan Mengetahui Diriku
Para Syuhada dan Jundillah Sepanjang Zaman
Serta Islam dan Seluruh Kaum Muslimin*

لَا يُكَلِّفُ اللَّهُ نَفْسًا إِلَّا وُسْعَهَا لَهَا مَا كَسَبَتْ وَعَلَيْهَا مَا اكْتَسَبَتْ رَبَّنَا لَا تُؤَاخِذْنَا
إِن نَّسِينَا أَوْ أَخْطَاْنَا رَبَّنَا وَلَا تَحْمِلْ عَلَيْنَا إصْرًا كَمَا حَمَلْتَهُ عَلَى الَّذِينَ مِن
قَبْلِنَا رَبَّنَا وَلَا تُحَمِّلْنَا مَا لَا طَاقَةَ لَنَا بِهِ ۗ وَاعْفُ عَنَّا وَارْحَمْنَا أَنْتَ
مَوْلَانَا فَانصُرْنَا عَلَى الْقَوْمِ الْكَافِرِينَ

Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya. ia mendapat pahala (dari kebajikan) yang diusahakannya dan ia mendapat siksa (dari kejahatan) yang dikerjakannya. (mereka berdoa): "Ya Tuhan kami, janganlah Engkau hukum kami jika kami lupa atau kami tersalah. Ya Tuhan kami, janganlah Engkau bebankan kepada kami beban yang berat sebagaimana Engkau bebankan kepada orang-orang sebelum kami. Ya Tuhan kami, janganlah Engkau pikulkan kepada kami apa yang tak sanggup kami memikulnya. beri ma'afilah Kami; ampunilah Kami; dan rahmatilah kami. Engkaulah penolong kami, Maka tolonglah kami terhadap kaum yang kafir."
(QS. Al Baqarah (2): 286).

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Assalamu'alaikum wr. wb.

Puji syukur saya panjatkan kehadiran Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat, taufik dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini dengan baik dan lancar. Sholawat serta salam semoga selalu tercurah kepada junjungan kita nabi besar Muhammad SAW beserta keluarga, para sahabat serta pengikut setianya hingga akhir zaman.

Skripsi dengan judul efek antiangiogenik alkaloid fraksi kloroform buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Farmasi (S.Farm) di Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia,

Keberhasilan penelitian dan penyusunan skripsi ini adalah berkat bantuan dari semua pihak. Untuk itu dalam kesempatan kali ini, penulis menghaturkan terima kasih kepada pihak-pihak yang mempunyai andil besar dalam pelaksanaan dan penyelesaian skripsi ini, terutama kepada :

1. drh. Retno Murwanti, MP selaku Dosen Pembimbing I yang telah meluangkan waktu, tenaga, pikiran serta telah memberikan dukungan selama penelitian sampai penyusunan skripsi, serta sebagai ketua tim penguji pada pendadaran skripsi.
2. Asih Triastuti, SF., Apt. selaku dosen Pembimbing II yang telah meluangkan waktu, tenaga, pikiran serta telah memberikan dukungan selama penelitian sampai penyusunan skripsi, serta sebagai anggota tim penguji pada pendadaran skripsi.
3. Siti Zahliyatul, SF., Apt. selaku Koordinator Laboratorium Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia beserta laboran yaitu Riyanto, Marno, Kuswandi, Hartanto, serta Diah yang telah membantu selama pelaksanaan penelitian.

4. Endang Darmawan, M.Si., Apt. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia, serta sebagai anggota tim penguji pada pendadaran skripsi.
5. Yandi Syukri, M.Si., Apt. selaku Ketua Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.
6. M. Hatta Prabowo, SF., Apt selaku Dosen Pembimbing Akademik
7. Dosen Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.
8. Mahasiswa Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia, khususnya angkatan 2002 (Leopard).
9. Dan semua pihak yang telah banyak membantu sehingga terlaksananya penelitian dan penyusunan skripsi ini

Penulis menyadari sepenuhnya, bahwa penelitian dan penyusunan skripsi ini tentu saja masih jauh dari sempurna dan masih banyak terdapat kekurangan, oleh karena itu penulis memohon ampun kepada Allah SWT dan memohon maaf kepada semua pihak atas kekurangan ini serta mengharapkan kritik dan saran sebagai perbaikan di hari mendatang sehingga bermanfaat untuk kemaslahatan kita semua.

Wassalamu'alaikum wr. wb.

Yogyakarta, 22 Juni 2006

Penulis,

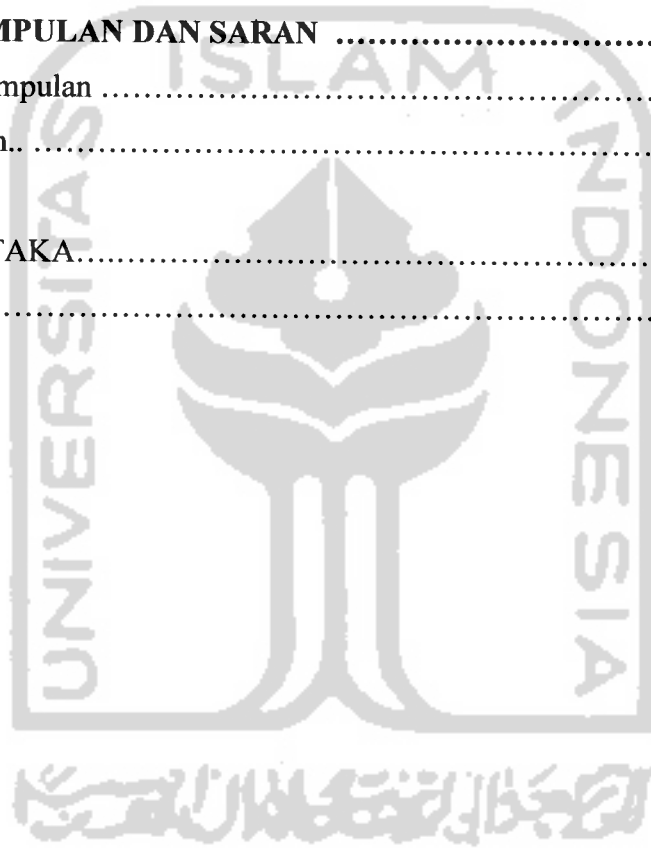
Ashadi

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN PEMBIMBING.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN PENGUJI.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
INTISARI	xiv
ABSTRACT.....	xv
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Perumusan Masalah	2
C. Tujuan Penelitian	2
D. Manfaat Penelitian.....	3
BAB II. STUDI PUSTAKA	4
A. Tinjauan Pustaka	4
1. Kanker	4
a. Tinjauan umum	4
b. Terminologi	6
c. Biologi molekuler kanker	6
d. Invasi dan metastasis.....	9
2. Karsinogenesis	10
3. Angiogenesis tumor	12
a. Tinjauan umum.....	12
b. Aktivator dan inhibitor angiogenesis.....	16

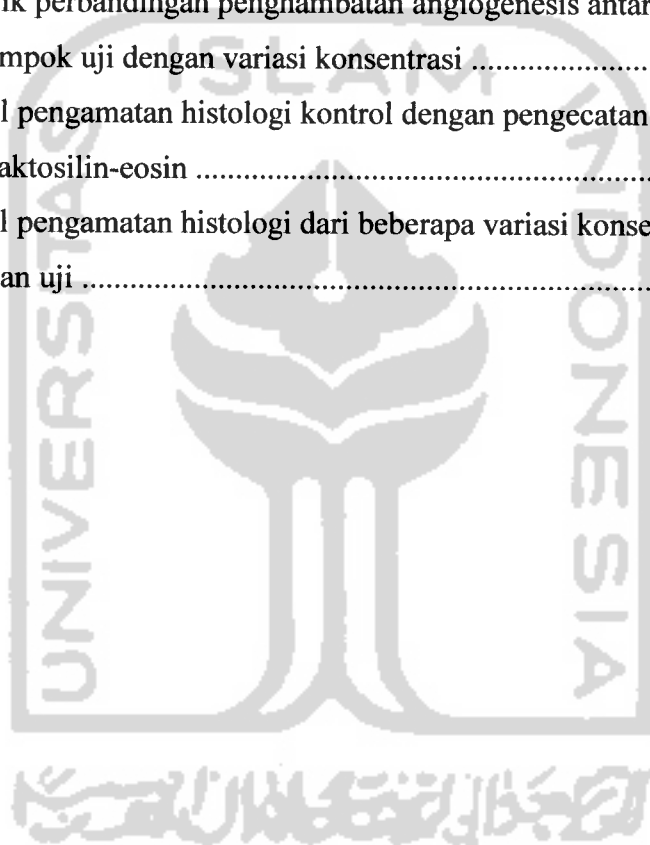
4. Pengobatan kanker dan angiogenesis	18
5. Mahkota dewa (<i>Phaleria macrocarpa</i> (Sceff.) Boerl.).....	22
a. Kalsifikasi tanaman	22
b. Morfologi tanaman	22
c. Nama daerah	23
d. Habitat dan penyebaran	23
e. Bagian yang digunakan	23
f. Kandungan kimia	23
g. Manfaat tanaman	24
6. Membran korio alantois dan perkembangan embrio ayam.....	24
7. Alkaloid	27
a. Ekstraksi alkaloid.....	28
b. Deteksi alkaloid.....	28
B. Landasan Teori	28
C. Hipotesis	29
BAB III. METODE PENELITIAN	30
A. Bahan Dan Alat	30
1. Bahan.....	30
2. Alat	30
B. Cara Penelitian	31
1. Identifikasi tanaman	31
2. Penyerbukan simplisia buah mahkota dewa	31
3. Penyarian alkaloid buah mahkota dewa	31
4. Kromatografi untuk deteksi alkaloid.....	31
5. Sterilisasi alat	32
6. Preparasi bFGF sebagai induktor angiogenesis	32
7. Preparasi sediaan larutan uji alkaloid ekstrak buah mahkota dewa	32
8. Uji daya hambat angiogenesis	32

9. Skematika penelitian.....	34
C. Analisis Hasil	35
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	37
A. Identifikasi Tanaman	37
B. Preparasi Alkaloid Buah Mahkota Dewa	37
C. Kromatografi Untuk Deteksi Alkaloid	38
D. Uji Daya Hambat Angiogenesis.....	40
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	46
A. Kesimpulan	46
B. Saran.....	46
DAFTAR PUSTAKA.....	47
LAMPIRAN	53



DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 1. Proses pembentukan pembuluh dara baru (angiogenesis)	16
Gambar 2. Tanaman mahkota dewa	22
Gambar 3. Struktur kimia dari beberapa alkaloid	28
Gambar 4. Deteksi alkaloid dengan metode KLT	39
Gambar 5. Perbandingan pembuluh darah kontrol	41
Gambar 6. Perbandingan jumlah pembuluh darah antar kelompok uji	41
Gambar 7. Grafik perbandingan penghambatan angiogenesis antar kelompok uji dengan variasi konsentrasi	43
Gambar 8. Hasil pengamatan histologi kontrol dengan pengecatan hemaktosilin-eosin	44
Gambar 9. Hasil pengamatan histologi dari beberapa variasi konsentrasi larutan uji	44



DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel I. Perbandingan aplikasi klinik antara kemoterapi sitotoksik dan terapi angiosupresan	21
Tabel II. Spesifikasi telur standar	24
Tabel III. Tahapan perkembangan embrio ayam	25
Tabel IV. Hasil analisa KLT dengan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak kloroform : metanol : NH ₄ OH _p (10 : 1 : 0,1)	40
Tabel V. Perbandingan jumlah pembuluh darah baru antar kelompok uji dengan variasi konsentrasi dibandingkan dengan kontrol bFGF+pelarut DMSO 0,8 %	42



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat keterangan determinasi tanaman mahkota dewa	Hal 53
Lampiran 2. Data kuantifikasi respon angiogenesis	54
Lampiran 3. Output SPSS	55



**EFEK ANTIANGIOGENIK
ALKALOID FRAKSI KLOOROFORM
BUAH MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.)
PADA MEMBRAN KORIO ALANTOIS (CAM)
EMBRIO AYAM YANG TERINDUKSI bFGF**

INTISARI

Angiogenesis merupakan peristiwa pertumbuhan pembuluh darah baru, yang mana pada sel kanker merupakan cara untuk mendapatkan suplai nutrisi dan oksigen, sehingga dapat terus bertahan hidup. Buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) adalah salah satu tanaman yang secara empiris telah digunakan sebagai obat anti kanker oleh masyarakat dan telah dikembangkan sebagai obat tradisional dalam bentuk kemasan siap pakai. Kandungan buah mahkota dewa terdiri dari golongan alkaloid, tanin, flavanoid, fenol, saponin, lignan, minyak atsiri dan sterol. Uji efek antiangiogenik dilakukan dengan membagi CAM telur berembrio umur 9 hari dalam tujuh kelompok perlakuan. Kelompok I sebagai kontrol *paper disc*, kelompok II sebagai kontrol bFGF, kelompok III sebagai kontrol bFGF+pelarut DMSO 0,8%, kelompok IV, V, VI, dan VII sebagai kelompok uji penghambatan angiogenesis, diberi bFGF 10 ng dan alkaloid fraksi kloroform buah mahkota dewa berturut-turut dengan konsentrasi 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, dan 400 µg/ml. Setelah diinkubasi selama 3 hari (umur 12 hari), telur dibuka dan isi telur dikeluarkan, kemudian membran korio alantois yang melekat pada cangkang diamati secara makroskopik dan mikroskopik. Hasil pengamatan makroskopik dikuantifikasi dan dianalisis efek penghambatannya. Hasil penelitian menunjukkan adanya aktivitas antiangiogenik dari alkaloid fraksi kloroform buah mahkota dewa, pada kelompok perlakuan (alkaloid) IV, V, VI dan VII berturut-turut adalah 19,10 %, 29,85 %, 43,88 % dan 51,04 %.

Kata kunci: angiogenesis, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.)Boerl., alkaloid, CAM, bFGF.

**ANTIANGIOGENIC EFFECT OF ALKALOIDS
FROM MAHKOTA DEWA'S FRUITS
(*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.)
IN CHICK CHORIO ALLANTOIC MEMBRANE (CAM)
INDUCED BY bFGF**

Abstract

Angiogenesis is neovascularization process, which in cancer cell, it supply nutrient and oxygen for cell survival. Mahkota dewa fruit has been empirically used as anticancer in society. Mahkota dewa fruit has been investigated to contain alkaloids, tannin, flavonoids, phenols, saponin, lignan, volatile oils and sterols. Angiogenesis inhibition test was done using Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) method. In this study, we divided CAM into 7 groups. Group I as paper disc control, group II as bFGF control, group III as bFGF+DMSO 0,8 % solvent control, and group IV, V, VI, and VII as test groups given 10 ng bFGF and alkaloids of chloroform fraction mahkota dewa fruit with different concentration (50, 100, 200 and 400 µg/ml). After 72 hours of incubation, eggs were opened and CAM, adhered eggshell, were observed macroscopically and microscopically. The result show that antiangiogenic activity from alkaloids of chloroform fraction were 19,10 % for 50 µg/ml concentration of extract, 29,85 % for 100 µg/ml, 43,88 for 200 µg/ml and 51,04 % for 400 µg/ml.

Key words: angiogenesis, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl., alkaloids, CAM, bFGF.

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Di banyak negara maju, kanker merupakan salah satu penyebab utama kematian. Di Amerika Serikat, kanker merupakan penyebab kematian kedua tersering setelah penyakit kardiovaskuler, lebih dari 20 persen orang Amerika meninggal akibat kanker (Anonim, 1996).

Kanker merupakan penyakit seluler yang kompleks dan melibatkan proses mikroevolusioner sehingga usaha penyembuhannya sangat sulit (Alberts *et al.*, 1994). Terapi kanker yang digunakan saat ini berupa terapi obat-obatan (kemoterapi, bioterapi), radiasi (terapi radiasi, penanaman radioaktif) dan terapi lainnya. Beberapa terapi di atas memiliki banyak kelemahan, antara lain biaya yang mahal serta efek sampingnya yang berat, selain itu keefektifan dan keamanannya kurang terjamin karena dapat pula merusak sel normal sehat yang berada di sekitar sel-sel target (Anonim, 1996).

Dalam beberapa tahun terakhir terjadi kemajuan besar dalam memahami dasar biologi dan biokimia kanker. Upaya pengobatan baru yang melibatkan imunoterapi dan obat yang mendorong pematangan sel normal masih bersifat eksperimental dan sedang dalam penelitian intensif. Sementara itu, telah dimulai pencarian senyawa yang dapat berinteraksi dengan produk onkogen, regulator gen, dan faktor pertumbuhan serta reseptornya (Harrison, 2000).

Angiogenesis tumor adalah proliferasi dari jaringan pembuluh darah yang menembus kedalam pertumbuhan kanker, menyuplai makanan dan oksigen serta mengeluarkan produk buangan (Kleinsmith *et al.*, 1999). Angiogenesis diketahui merupakan kunci bagi perkembangan kanker (Giavazzi *et al.*, 2000). Angiogenesis diperlukan oleh tumor kanker untuk tetap tumbuh dan menyebar, tanpa angiogenesis pertumbuhan tumor akan terhenti (Kleinsmith *et al.*, 1999).

Buah mahkota dewa secara empiris telah digunakan sebagai obat anti kanker oleh masyarakat dan telah dikembangkan sebagai obat tradisional dalam bentuk kemasan siap pakai (Mahendra, 2005). Hasil penelitian ilmiah yang pernah dilakukan sebelumnya yaitu efek sitotoksik ekstrak buah dan daun mahkota dewa

terhadap sel Hela (sel kanker rahim) secara *in vitro* menunjukkan bahwa buah mahkota dewa memiliki efek sebagai anti kanker, namun mekanisme aksinya sebagai anti kanker masih belum diketahui secara pasti (Sumastuti and Sonlimar, 2002). Salah satu mekanisme aksi dari suatu obat anti kanker adalah melalui penghambatan pembentukan pembuluh darah baru atau antiangiogenik. Penelitian efek antiangiogenik dari tanaman ini merupakan dukungan terhadap penggunaannya sebagai obat anti kanker secara ilmiah di masyarakat.

B. Perumusan Masalah

Mekanisme pembentukan kanker yang sangat kompleks menjadikan penelitian penemuan obat anti kanker menjadi sesuatu yang sangat penting dan berguna. Angiogenesis dibutuhkan dalam pertumbuhan, perkembangan, dan penyebaran kanker sehingga pengembangan senyawa inhibitor angiogenesis menjadi hal yang sangat menjanjikan dalam usaha penyembuhan kanker.

Buah mahkota dewa mengandung beberapa senyawa kimia, yaitu alkaloid, tanin, flavanoid, fenol, saponin, lignan, minyak atsiri dan sterol. Alkaloid adalah senyawa kimia yang mempunyai aktivitas farmakologi yang menonjol dan telah digunakan secara luas dalam bidang pengobatan. Suatu senyawa dapat berkhasiat sebagai anti kanker melalui beberapa mekanisme aksi, salah satunya melalui penghambatan pembentukan pembuluh darah baru atau antiangiogenesis. Berdasarkan hasil penelitian ilmiah yang pernah dilakukan sebelumnya mengenai khasiat buah mahkota dewa sebagai anti kanker serta menilik pada senyawa kimia yang terkandung di dalamnya, timbul pertanyaan apakah senyawa alkaloid dari buah mahkota dewa mempunyai efek antiangiogenik atau tidak.

C. Tujuan Penelitian

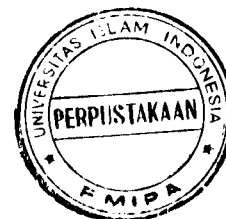
Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari efek antiangiogenik senyawa alkaloid fraksi kloroform buah mahkota dewa pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam terinduksi bFGF.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk mengetahui zat aktif dari buah mahkota dewa yang berkhasiat sebagai anti kanker beserta mekanisme kerjanya serta mendukung penggunaan buah mahkota dewa sebagai obat anti kanker di masyarakat.



BAB II STUDI PUSTAKA



A. Tinjauan Pustaka

1. Kanker

a. Tinjauan umum

Kata kanker, neoplasia, dan keganasan biasanya dapat saling dipertukarkan baik dalam kepustakaan ilmiah maupun populer. Penyakit yang disebut *kanker* paling baik bila didefinisikan berdasarkan empat karakteristik yang menjelaskan bagaimana sel kanker berlaku berbeda dengan sel normal:

- 1) *Klonalitas*; Kanker berasal dari perubahan genetik yang terjadi pada sebuah sel, yang kemudian berproliferasi membentuk klon sel ganas. Kelainan klonal pada susunan genetik sel yang dapat dideteksi dengan teknik molekular adalah mutasi, penyusunan ulang, translokasi, delesi, dan amplifikasi gen.
- 2) *Autonomi*; Pertumbuhan tidak teratur dengan benar oleh pengaruh biokimia dan fisik normal dalam lingkungan (autostimulasi, ekspresi reseptor, angiogenesis).
- 3) *Anaplasia*; Tidak terdapat diferensiasi sel yang normal dan terkoordinasi (kelainan seluler dan histologik).
- 4) *Metastasis*; Sel kanker memiliki kemampuan tumbuh secara tidak kontinu dan menyebar kebagian tubuh lain (invasi) (Harrison, 2000).

Kanker terjadi karena adanya enam perubahan mendasar dalam fisiologi sel yang akhirnya tumbuh menjadi maligna, yaitu:

- 1) Mampu mencukupi kebutuhan akan signal pertumbuhan (*growth factor*)

Sel normal membutuhkan signal pertumbuhan sebelum berpindah dari fase istirahat menuju fase pembelahan yang aktif. Tetapi pada sel kanker, tanpa adanya signal pertumbuhan tetap akan tumbuh karena mampu mencukupi kebutuhan akan signal pertumbuhan sendiri.

- 2) Tidak sensitif terhadap signal anti pertumbuhan (*antigrowth factor*)

Sel normal yang aktif membelah apabila menerima signal anti pertumbuhan maka ia akan berhenti tumbuh dan selanjutnya berdiferensiasi. Tetapi pada

kanker, tidak sensitif terhadap signal anti pertumbuhan sehingga akan terus tumbuh walaupun signal anti pertumbuhan dikeluarkan oleh sel-sel di sekitarnya.

3) Mampu menghindari proses *apoptosis*

Apoptosis merupakan salah satu mekanisme alami sel tubuh untuk mempertahankan keseimbangannya, dengan cara melakukan 'bunuh diri' terhadap sel-sel yang mengalami kelainan susunan genetik. Proses ini diatur oleh *oncogene* dan *gene tumor suppressor*. Overekspresi *oncogene* menyebabkan sel kanker menjadi '*immortal*'.

4) Memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas

Adanya kemampuan kanker di atas (1-3) menyebabkan kanker tumbuh tidak terbatas. Selain itu kanker mampu melakukan upregulasi telomerase. Pada sel normal, ketika sel telah membelah diri sampai jumlah tertentu maka ia akan berhenti tumbuh, dan kemudian mati. Hal ini diatur oleh telomer, yaitu sekuen DNA ujung kromosom. Telomer berfungsi untuk menjaga ujung DNA dari kerusakan. Setiap kali terjadi replikasi DNA, ujung telomer akan terpotong (memendek), sampai pada panjang tertentu (titik kritik) dan sel akan mengalami *senescence* (kematian). Pada sel kanker, telomerase akan melindungi telomer dari degradasi selama proses replikasi sehingga panjangnya tetap yang mengakibatkan sel menjadi *immortal*.

5) Memiliki kemampuan angiogenesis

Seperti halnya dengan sel normal, kanker membutuhkan nutrisi dan oksigen untuk pertumbuhannya. Kebutuhan akan nutrisi sel-sel kanker dicukupi melalui proses pembentukan pembuluh darah baru yang memungkinkan sel-sel kanker mendapatkan nutrisi dari pembuluh darah asal.

6) Bersifat invasif dan metastasis

Setelah menjadi massa yang besar, sel kanker bersifat mendesak/invasif terhadap sel-sel di sekitarnya. Sel kanker bisa melepaskan sel-sel primer dan berpindah ke jaringan/organ lain di dalam tubuh via limfatik/pembuluh darah (metastasis) (Hanahan and Weinberg, 2000).

b. Terminologi

Tumor (neoplasma) adalah suatu pertumbuhan/pembengkakan massa dari sel yang abnormal. Selama sel neoplastik ini tumbuh dan membentuk suatu massa, disebut sebagai *benigna* (jinak) dan tumor disebut sebagai kanker apabila telah menjadi *maligna* (ganas) (Bosman, 1999; Alberts *et al.*, 1994).

Kanker diberi nama menurut tipe dari jaringan dimana kanker itu tumbuh. Misalnya *sarkoma* merupakan neoplasma pada jaringan mesoderm, diantaranya jaringan ikat, tulang, dan otot. Tumor pada jaringan epitel seperti membran mukosa dan kelenjar (diantaranya kanker payudara, ovarium, dan paru-paru) dinamakan *carcinoma*. Kanker darah atau pada jaringan hemopoetik dikenal sebagai *blastoma* (leukemia), termasuk di dalamnya sel limfoid, eritrosit, dan myeloid yang secara umum termasuk golongan *sarkoma* (Thurston and Lobo, 1998).

Selain itu beberapa kanker diberi nama menurut fase pertumbuhannya, seperti *displasia* adalah sel-sel superfisial yang menunjukkan tanda-tanda diferensiasi yang mirip dengan sel asalnya tetapi memiliki keabnormalan dalam proliferasi. *Carcinoma in situ*, adalah pertumbuhan sel yang mencapai batas lapisan permukaan jaringan tetapi masih terkumpul menjadi satu massa yang besar. Sedangkan *maligna carcinoma* adalah sel kanker yang mampu merusak basal lamina dan mulai menginvasi jaringan di sekitarnya (Alberts *et al.*, 1994).

c. Biologi molekuler kanker

Mekanisme molekuler yang mendasari kelainan genetik pada kanker telah mulai dipahami. Mekanisme tersebut tampaknya tergolong dalam dua kelompok besar, yaitu:

- 1) *Onkogen* adalah gen yang dapat menyebabkan transformasi maligna bila diekspresikan secara tidak sesuai, akibat mutasi, amplifikasi, atau penyusunan ulang. Pada sebagian besar kasus, gen ini mengkode faktor pertumbuhan atau molekul lain yang berperan dalam jalur transduksi signal, atau faktor transkripsi yang mengatur ekspresi gen. Ekspresi berlebihan gen ini menyebabkan aktivitas konstitutif molekul pengatur kunci yang secara normal mengalami modulasi selama siklus sel.

2) *Gen supresor* bekerja dengan menghambat pertumbuhan sel, dan sekelompok gen terkait dapat bekerja dengan menginduksi kematian sel terprogram (*apoptosis*). Gen ini berperan dalam tumorigenesis bila lenyap atau inaktif (Harrison, 2000).

Onkogen merupakan gen yang mengontrol perilaku sel neoplastik. Onkogen dapat diklasifikasikan menjadi lima kelompok sesuai dengan fungsi produk gen (onko-protein), yaitu: *Nuclear-binding oncoprotein* yang ikut dalam pengaturan proliferasi seluler (misalnya *myc*), aktivitas tirosin kinase (misalnya *src*), faktor tumbuh (misalnya *sis koding* untuk fibrin berasal dari faktor tumbuh), reseptor untuk faktor tumbuh (misalnya *erbB koding* untuk reseptor faktor tumbuh epidermal), *cyclic nucleotide binding activity* (misalnya *ras* dan GPT) yang mengganggu signal intraseluler (Underwood, 1999).

Pengaruh produk onkogen pada pertumbuhan tumor, antara lain: ketidakterikatan permintaan untuk faktor tumbuh ekstrinsik, terbentuknya tumor apabila disuntikkan ke dalam binatang yang mempunyai toleransi imunologis, produksi aktivator plasminogen dan protease untuk membantu proses invasi, berkurangnya daya kohesi sel, sehingga membantu metastasis, immortalisasi, peningkatan dari membran plasma dan motilitas seluler, tumbuh ke arah kepadatan sel yang lebih tinggi, serta orientasi seluler yang abnormal (Underwood, 1999).

Ada dua jenis gen penghambat tumor yang dikenal. Pertama, gen Rb, gen penghambat pertama yang diketahui dengan baik ialah gen Rb1 yang berkaitan dengan retinoblastoma. Retinoblastoma adalah tumor ganas yang berasal dari retina, terutama ditemukan pada anak-anak. Kedua, gen p53, gen penghambat tumor p53 terletak pada lengan pendek kromosom 17, sering mengalami mutasi dan dipelajari dengan ekstensif pada kanker. Fungsi normal p53 ialah mampu memperbaiki DNA yang rusak sebelum fase S dalam siklus sel dengan mengistirahatkan siklus sel dalam G₁ sampai perbaikan selesai dan mematikan sel secara apoptotik apabila terdapat kerusakan DNA yang hebat (Underwood, 1999).

Level p53 meningkat dalam sel yang mengalami kerusakan DNA, sampai kerusakan diperbaiki atau sel mengalami apoptosis. Hal ini mencegah

kemungkinan mutasi gen. Ini merupakan fungsi penting dari p53 sehingga disebut sebagai 'pengawal gen' (Underwood, 1999).

P53 dapat kehilangan fungsi normalnya akibat berbagai mekanisme, yaitu:

- a) Mutasi yang menyebabkan gen tidak dapat dibaca/dikenal (*non-sense mutations*) atau terkode untuk protein yang cacat (*mis-sense mutations*).
- b) Kompleks antara p53 yang normal dengan mutan p53 (pada individu atau sel yang heterozigot) mengakibatkan tidak aktifnya fungsi alel yang normal.
- c) Pengikatan p53 yang normal kepada protein terkode oleh virus onkogenik DNA (misalnya human papilloma virus [HPV], polioma virus) (Underwood, 1999).

Adanya perubahan atau mutasi pada gen yang menyandi protein ini dapat mengakibatkan meningkatnya aktivitas signal transduksi yang memacu perkembangan sel (Guo & Hay, 1999). Pada kanker, *protooncogene* teraktivasi menjadi *oncogene* karena adanya perubahan genetik, seperti mutasi, penyusunan ulang kromosom, dan amplifikasi gen. Perubahan genetik ini dapat disebabkan karena agen karsinogen seperti radiasi, senyawa kimia tertentu, virus (mutasi somatik) atau dapat juga diturunkan (*germ-line mutation*) sehingga pertumbuhan sel dipacu. Sementara *tumor suppressor gene* (TSG) inaktif/rusak sehingga terjadi pertumbuhan sel yang tidak terkendali.

Siklus pertumbuhan sel secara biokimiawi dibedakan menjadi empat fase, yaitu:

1) Fase G₁ (*Growth phase-1*)

Fase ini lamanya sangat bervariasi dari beberapa jam sampai tahunan. Pada fase G₁ sel anak yang baru terbentuk setelah mitosis tumbuh menjadi sel dewasa, membentuk protein dan enzim. Kromosomnya hanya mengandung rantai tunggal DNA (haploid). Sel dewasa masuk ke zona perbatasan yang menentukan apakah sel itu akan berhenti tumbuh (masuk ke fase G₀). Sel yang masuk ke fase G₀ terbagi menjadi 2, yaitu stem sel dan sel yang tetap tidak tumbuh. Selain itu ada juga sel yang terus tumbuh dan sel ini akan masuk ke fase S.

2) Fase S (*Synthetic phase*)

Fase S lamanya 6-8 jam. Pada fase ini dibentuk rantai DNA baru, protein, enzim untuk persiapan fase M berikutnya. Replikasi DNA terjadi dengan bantuan

enzim DNA-polimerase. Dengan dibentuknya DNA baru maka rantai tunggal DNA menjadi rantai ganda.

3) Fase G₂ (*Growth phase-2*)

Fase ini lamanya 1-2 jam. Pada fase ini dibentuk RNA, protein, enzim untuk persiapan fase M berikutnya.

4) Fase M (*Mitotic phase*)

Pada fase M tidak ada kegiatan kimiawi. Terjadi pembelahan sel, dari 1 sel induk membelah menjadi 2 sel anak yang mempunyai struktur genetik yang sama dengan sel induknya. Rantai ganda sel DNA yang merupakan pembawa informasi gen terbelah menjadi 2 rantai tunggal, yang masing-masing untuk sel anak terbaru (Sukardja, 2000).

d. Invasi dan metastasis

Invasi merupakan kriteria yang penting untuk keganasan. Invasi terjadi karena motilitas sel yang abnormal, kurangnya kohesi seluler dan produksi enzim proteolitik (matriks metaloproteinase, misal; interstitial kolagenase, gelatinase, stromelisin) (Underwood, 1999).

Metastasis merupakan proses pembentukan tumor sekunder yang letaknya jauh. Sel neoplastik harus berhasil melengkapi pancaran peristiwa (metastatik kaskade) sebelum membentuk suatu tumor metastatik (Underwood, 1999).

Tahapan yang terjadi pada metastatik kaskade, yaitu: pelepasan sel tumor dari lingkungannya, kemudian invasi ke jaringan ikat sekitarnya mencapai jalur untuk metastasis (pembuluh darah dan pembuluh limfe). Selanjutnya intravasasi kedalam lumen pembuluh darah atau pembuluh limfe, evasi (menghindari) terhadap mekanisme pertahanan inang, seperti sel NK (*natural killer cells*) dalam darah, lalu pelekatan pada endotelium pada tempat pindahan/tujuan dan akhirnya ekstrasvasi sel dari lumen pembuluh darah/limfe kedalam jaringan sekitarnya (Underwood, 1999).

Setelah sampai ditempat metastasis, terjadi pengulangan peristiwa yang diperlukan untuk membentuk tumor primer. Sel tumor harus berproliferasi dan apabila tumor tumbuh membentuk benjolan dengan diameter yang lebih besar dari

1-2 milimeter, pertumbuhan didalam pembuluh darah harus didesak keluar oleh faktor angiogenik (Underwood, 1999).

Metastasis terjadi melalui beberapa jalur, yaitu:

- 1) *Hematogen*, melalui pembuluh darah untuk membentuk tumor sekunder dalam organ yang menerima darah melalui pembuluh darah yang mengalir dari tumor primer.
- 2) *Limfogen*, membentuk tumor sekunder pada kelenjar limfe regionalnya.
- 3) *Transcoelomic*, dalam rongga pleural, perikardial dan peritoneal, yang menghasilkan bermacam-macam efusi neoplastik.
- 4) *Implantasi*, sebagai contoh secara tidak sengaja membuang sel tumor sewaktu melakukan operasi (Underwood, 1999).

Karsinoma cenderung mengikuti penyebaran limfatik, sedangkan sarkoma cenderung memilih penyebaran hematogen. Walaupun begitu, ada beberapa pengecualian dari kecenderungan ini, yakni karsinoma dapat menghasilkan metastasis melalui pembuluh darah (Underwood, 1999).

2. Karsinogenesis

Karsinogenesis merupakan suatu proses yang memberikan hasil suatu transformasi sel normal menjadi sel neoplastik yang disebabkan oleh perubahan genetik yang menetap atau mutasi. Tumor tumbuh dari sel tunggal yang mengalami transformasi oleh penumpukan/akumulasi proses mutasi. Paparan terhadap bahan karsinogen akan meningkatkan kemungkinan terjadinya mutasi yang spesifik. *Karsinogen* merupakan agen yang telah diketahui atau dianggap ikut berperan pada penyebab terjadinya tumor. Agen/bahan tersebut dikatakan sebagai *karsinogenik* (penyebab kanker) atau *onkogenik* (penyebab tumor). Tempat sasaran aksi seluruh karsinogen ialah DNA yang gennya mengalami pengkodean., karena itu karsinogen juga *mutagenik*. Lebih dari satu karsinogen sangat sering memungkinkan terbentuknya tumor dari jaringan dan sel yang normal, dan merupakan suatu bukti yang baik bahwa proses akan terjadi dalam beberapa tahapan yang berkesinambungan, kondisi ini dikenal sebagai *hipotesis multistep* (Underwood, 1999).

Kelompok utama bahan/agen karsinogenik adalah:

- 1) Bahan kimia (polisiklik aromatik karbon, aromatik amin, nitrosamin, zat warna azo, agen alkilating).
- 2) Virus (virus Epstein-Barr, *human papillomavirus* [HPV], virus Hepatitis B).
- 3) Radiasi pengion dan bukan pengion (sinar UV, sinar-X, uranium radioaktif, iodin radioaktif).
- 4) Hormon (estrogen, steroid androgenik), mikotoksin (aflatoksin B₁) dan parasit (*Schistosoma*, *Clonorchis sinensis*).
- 5) Bahan-bahan lain (asbestos, metal) (Underwood, 1999).

Ada empat fase pembentukan kanker (karsinogenesis), yaitu: inisiasi, promosi, progresi dan metastasis.

1) Inisiasi

Merupakan tingkatan pertama dari karsinogenesis, merupakan hasil perubahan genetik menuntun proliferasi abnormal sebuah sel berubah menjadi *pre-maligna*. Sel yang mengalami inisiasi atau pra kanker dapat kembali ke tingkat normal secara spontan tetapi dapat pula meningkat lebih lanjut menjadi ganas (Schneider, 1997).

2) Promosi

Promosi merupakan tingkat lanjutan dari inisiasi. Pada fase ini, sel-sel akan mengalami beberapa keuntungan yang selektif untuk tumbuh, sehingga pertumbuhan menjadi lebih cepat dan berubah bentuk menjadi tumor jinak. Promosi sampai saat ini hanya terjadi secara somatik (Schneider, 1997).

3) Progresi

Pada fase progresi, perubahan genetik menuntun pada terbentuknya koloni sel yang lebih besar dengan peningkatan kemampuan tumbuh dan muncul keistimewaan-keistimewaan yang lain (seperti peningkatan mobilitas dan angiogenesis). Pada progresi ini timbul perubahan *benigna* menjadi *pre-maligna* dan *maligna* (Schneider, 1997; Sukardja, 2000).

4) Metastasis

Metastasis melibatkan beberapa tahap yang berbeda, termasuk memisahkannya sel kanker dari tumor primer, masuk ke dalam sirkulasi dan limfatik serta perlekatan pada permukaan jaringan baru (Schneider, 1997).

3. Angiogenesis tumor

a. Tinjauan umum

Pembentukan pembuluh darah baru keluar dari kapiler yang sudah ada atau angiogenesis adalah suatu urutan peristiwa penting dalam kesatuan yang luas dari proses fisiologik dan patologik. Pertumbuhan jaringan normal, seperti perkembangan embrional, penyembuhan luka dan siklus menstruasi ditandai oleh ketergantungan pada pembentukan pembuluh darah baru untuk mensuplai oksigen dan nutrisi serta membuang produk sisa. Beberapa penyakit yang berbeda dan tidak saling terkait, juga berhubungan dengan pembentukan aliran darah baru, termasuk diantaranya kerusakan jaringan setelah reperfusi dari jaringan iskemik atau gagal jantung, dimana angiogenesis rendah dan harus ditingkatkan untuk memperbaiki kondisi penyakit (Carmeliet *et al.*, 1999 *cit* Griffioen and Molema, 2000).

Pada beberapa penyakit, angiogenesis yang berlebihan adalah bagian dari patologi. Penyakit ini meliputi kanker (tumor padat dan hematologik), penyakit kardiovaskuler, diabetes retinopati, psoriasis, endometriosis dan adipositi. Penyakit-penyakit ini dapat diatasi dengan terapi inhibisi dari angiogenesis (Folkman, 1995 *cit* Griffioen and Molema, 2000). Saat ini terapi antiangiogenesis merupakan pendekatan yang menjanjikan dalam upaya membuat terobosan yang diperlukan dalam terapi kanker dan penyakit proangiogenik lainnya (O'Reilly *et al.*, 1994).

Pembuluh darah terdiri dari sel endotelial yang kontak langsung dengan darah dan subendotelial tempat perisites, sel otot polos, fibroblas, lapisan dasar membran dan matriks ekstraseluler. Tergantung dari lokasinya didalam tubuh, lingkungan mikro organ, konstituen seluler, lapisan dasar membran dan matriks ekstraseluler dari saluran pembuluh darah berbeda dalam fenotip, komposisi dan fungsi (Rajotte *et al.*, 1998).

Sel endotelial membentuk suatu *monolayer* didalam setiap pembuluh darah tunggal dalam sirkulasi dan secara aktif terlibat dalam beberapa proses pengaturan di dalam tubuh. Selain itu, aktif secara metabolik dan permeabel selektif terhadap zat terlarut dan peptida/protein serta mengatur pembekuan darah.

Untuk menjaga integritasnya, sel endotelial menggunakan sifat antikoagulatif dengan sintesis dari *thrombomodulin*, inhibitor jalur faktor jaringan (TF) dan aktivator jaringan-tipe plasminogen (tPA). Saat aktivasi maupun rusak, sel endotelial dengan cepat melepaskan protein seperti faktor multimerik Von Willebrand (vWF), yang mempromosikan adhesi dan agregasi platelet dan aktivator inhibitor-1 plasminogen (suatu bagian dari keluarga serpin). Ekspresi TF oleh endotelium menyebabkan inisiasi dari jalur pembekuan darah intrinsik (Verstraete, 1995 *cit* Griffioen and Molema, 2000). Keistimewaan lain dari sel endotelial adalah kemampuannya untuk mengarahkan sel sistem imun ke lokasi spesifik dalam tubuh. Sebagai molekul dasar pengekspresian atau penyebab adhesi seluler sitokin [*E-selectin* dan *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1)] dan faktor terlarut seperti *chemoattractants*, *cytokines* dan *chemokines* bertindak dalam perekrutan sel imun ke organ limfoid atau lokasi peradangan (Carlos and Harlan, 1994).

Sel endotelial secara aktif terlibat selama pengubahan model (*remodeling*) saluran pembuluh darah, seperti pada ovulasi, penyembuhan luka, pertumbuhan tumor dan diabetes retinopati.

Proses molekuler dari pembentukan pembuluh darah baru:

1) Inisiasi dari respon angiogenik

Angiogenesis dengan cepat diaktifkan sebagai respon atas kondisi hipoksia atau iskemik. Sebagai contoh, relaksasi vaskuler diperantarai oleh nitrogen oksida (NO) menjadi prasyarat bagi sel endotelial untuk memasuki urutan proses angiogenik. Kemungkinan perubahan morfologi dari sel endotelial mendorong penurunan status pengikatan agar menjadi peka untuk membelah (Folkman, 1997 *cit* Griffioen and Molema, 2000). Pada seluruh tipe dari angiogenesis, baik pada kondisi fisiologis maupun patologis, aktivasi sel endotelial merupakan proses awal yang berlangsung. Sitokin dari beberapa sumber dilepaskan sebagai respon terhadap hipoksia atau iskemia. Diduga bahwa *vascular endothelial growth factor* (VEGF) adalah pelaku utama pada pengaktifan/inisiasi angiogenesis didasarkan pada kemampuannya untuk menginduksi vasodilatasi dengan cara memproduksi NO endotelial, dimana perubahan dari permeabilitas sel endotelial akan meningkatkan efek dari inisiasi (Ziche *et al.*, 1997). VEGF berlebih diproduksi

oleh sel tumor hipoksia, makrofag dan sel lain dari sistem imun (Brown *et al.*, 1997). Selain mempengaruhi vasodilatasi dan permeabilitas vaskuler, VEGF dapat merangsang ekspresi dari protease dan reseptor penting dari invasi seluler, perubahan model jaringan serta dapat mencegah *apoptosis* dari sel endotelial (Ferrara and Keyt, 1997 *cit* Griffioen and Molema, 2000).

2) Migrasi dan proliferasi sel endotelial

Aktivator plasminogen u-PA dan t-PA mengubah plasminogen protein plasma menjadi plasmin. Plasmin memiliki spesifitas dan turunan yang luas seperti tripsin yaitu fibrolektin, laminin dan inti protein proteoglikan, plasmin juga mengaktifkan metaloproteinase yang penting. Plasmin dipercaya sebagai protease yang paling penting dalam mobilisasi faktor pertumbuhan *fibroblast-2* (FGF-2 atau *basic* FGF) dari lingkungan ekstraseluler (ECM). FGF secara langsung bertindak sebagai molekul proangiogenik. Angiogenesis sangat peka terhadap perubahan kecil dari faktor-faktor seperti VEGF dan FGF-2 yang mengendalikan proses angiogenik, hal ini memiliki implikasi terapeutik yang penting dalam penanganan kelainan kendali angiogenesis (Czubayko *et al.*, 1997).

3) Maturasi dari neovaskuler

Interaksi sel endotelial dengan ECM dan sel mesenkim merupakan prasyarat untuk membentuk vaskuler yang stabil. Oleh karena itu, setelah proliferasi sel endotelial, maturasi dan pembentukan struktur tabung endotelial, melingkupi lapisan pembuluh yang terdiri dari sel mural (perisites pada pembuluh kecil dan otot polos pada pembuluh besar) perlu dilakukan. Sel endotelial dapat memenuhi hal ini dengan cara sintesis dan sekresi *platelet-derived growth factor* (PDGF), suatu mitogen dan perangsang kimia untuk berbagai jenis sel mesenkim (Hirschi and D'Amore, 1997).

FGF-1 juga mempengaruhi diferensiasi dari sel endotelial dengan mendorong pembentukan tabung vaskuler. Selain menginduksi aktivator plasminogen, proliferasi dan migrasi sel endotelial, pemberian signal reseptor FGF-1 menghasilkan pembentukan tabung endotelial dalam kolagen (Kanda *et al.*, 1996).

Angiopietin dan tirosin kinase reseptor Tie-1 dan Tie-2 juga memegang peran penting pada tahapan berikutnya dari angiogenesis, mereka diperlukan

untuk komunikasi antara sel endotelial dengan mesenkim yang melingkupi untuk menetapkan seluler yang stabil dan interaksi biokimia (Maisonpierre *et al.*, 1997 *cit* Griffioen and Molema, 2000).

4) Mekanisme lain yang mempengaruhi kontrol angiogenesis

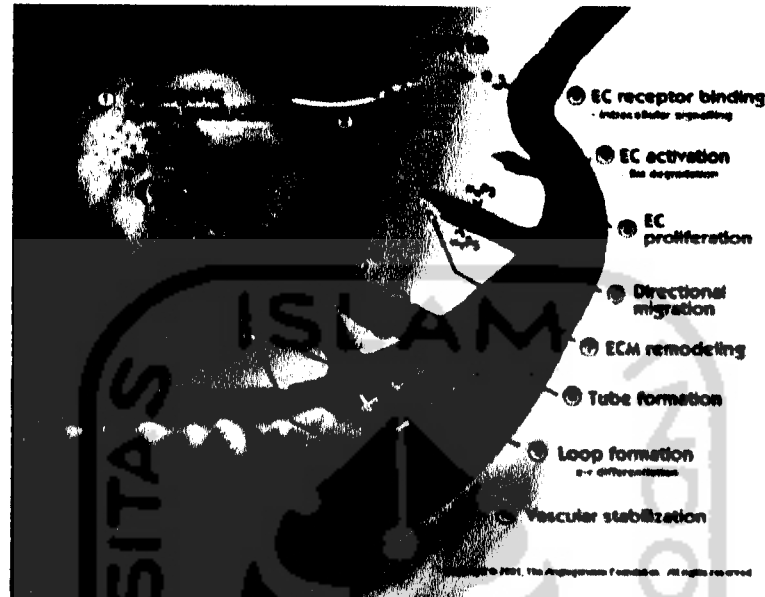
Aktivitas dari pengatur angiogenesis sitokin bergantung pada adanya dan konsentrasi dari faktor lain atau sitokin didalam lingkungan dari endotelial yang merespon (Pepper *et al.*, 1998). Sebagai contoh, faktor eksogen seperti hormon dapat menyebabkan kondisi yang mengarah ke angiogenesis (Schiffenbauer *et al.*, 1997). Isoform dari VEGF yang mengikat pada ECM-terikat proteoglikan heparan sulfat dapat melepaskan ECM-berisi FGF-2 dalam bentuk bioaktif (Jonca *et al.*, 1997). dan angiopoietin meningkatkan efek dari VEGF (Asahara *et al.*, 1998).

Tahapan angiogenesis meliputi beberapa proses, yaitu:

- 1) Jaringan yang sakit/terluka (kanker) memproduksi dan melepaskan faktor pertumbuhan angiogenik (protein AGF) yang kemudian berdifusi ke jaringan sekitarnya.
- 2) AGF berikatan dengan reseptor spesifik pada permukaan sel endotelial dari pembuluh darah jaringan sekitar yang sudah ada.
- 3) Adanya ikatan antara AGF dan reseptornya ini mengaktifkan sel endotelial. Signal dikirimkan dari permukaan sel ke inti sel (nukleus). Sel endotelial mulai memproduksi molekul-molekul baru, termasuk enzim.
- 4) Enzim ini akan merusak lubang-lubang kecil pada membran basalis yang melingkupi seluruh pembuluh darah.
- 5) Sel endotelial mulai berproliferasi dan bermigrasi ke luar melalui lubang yang telah rusak oleh enzim tadi menuju jaringan yang memproduksi AGF tersebut (kanker).
- 6) Molekul khusus disebut molekul adhesi atau integrin berperan sebagai kait, membantu menarik keluar pembuluh darah baru tersebut.
- 7) Enzim lain yaitu *matrix metalloprotease* (MMP), diproduksi untuk merusak jaringan di sepanjang jalan yang akan dilalui oleh pembuluh darah baru menuju jaringan yang memproduksi faktor pertumbuhan tersebut (kanker).
- 8) Pembuluh darah baru yang telah berproliferasi tadi kemudian menggulung membentuk pipa pembuluh darah.

9) Pipa pembuluh darah yang terbentuk ini sambung menyambung dengan pipa pembuluh darah yang lain sehingga dapat mengedarkan darah.

10) Pembuluh darah baru, distabilkan strukturnya oleh perisites, suatu sel otot yang lunak (Anonim, 2000).



Gambar 1. Proses pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) (Rosen, 2002).

b. Aktivator dan inhibitor angiogenesis

Dari hasil penelitian diketahui bahwa sel kanker dapat melepaskan molekul yang mengaktifkan/menstimulasi angiogenesis, yaitu:

1) Aktivator angiogenesis

Pada beberapa studi, lebih dari selusin protein berbeda termasuk beberapa molekul kecil diketahui sebagai 'angiogenic', artinya mereka dilepaskan oleh tumor sebagai signal angiogenesis. Dua jenis molekul protein paling penting yang menyokong pertumbuhan tumor adalah *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan *basic fibroblast growth factor* (bFGF). VEGF dan bFGF dihasilkan oleh banyak jenis sel kanker dan tipe tertentu dari sel normal.

Inisiasi angiogenesis disebabkan oleh meningkatnya sekresi faktor-faktor pembuluh oleh tumor, seperti PDGF, FGF dan VEGF, produksinya sedikit pada sel normal namun meningkat pada keadaan kanker dan pada sel normal yang berada pada lingkungan beroksigen rendah (hipoksia).

Beberapa senyawa proangiogenik yang telah dikenal, yaitu:

1) *VEGF*

Angiogenesis dikendalikan oleh banyak mediator yang diproduksi oleh beberapa sel pada berbagai kondisi. Mediator-mediator ini larut dalam ECM, dinding membran faktor tumbuh atau dalam komponen dari ECM. Dari beberapa faktor terlarut ini, salah satu yang telah diketahui dengan baik dan merupakan faktor proangiogenik yang paling poten adalah VEGF, ditemukan pada awal 80-an oleh Dvorak dkk (Senger *et al.*, 1983 *cit* Griffioen and Molema, 2000). Isoform VEGF adalah hasil penyambungan alternatif dari gen VEGF tunggal yang berada pada kromosom 6 (Mattei *et al.*, 1996 *cit* Griffioen and Molema, 2000).

VEGFR-1 dan VEGFR-2 diekspresikan pada endotelium vaskuler, sedikit pada monosit/makrofag dan beberapa tipe sel tumor penting. VEGFR-3 yang mengikat VEGF-C dan VEGF-D terutama diekspresikan pada endotelium limfatik (Kaipainen *et al.*, 1995). Jalur transduksi signal interseluler pada sel endotelial melalui dimerisasi VEGFR-2 menyebabkan peningkatan permeabilitas, proliferasi seluler dan migrasi (Yu and Sato, 1999 *cit* Griffioen and Molema, 2000).

2) *FGF*

Golongan FGF juga merupakan penginduksi poten dari angiogenesis. Respon seluler yang diperantarai oleh FGF diantaranya migrasi sel, proliferasi dan diferensiasi (Kanda *et al.*, 1997). Golongan FGF terdiri dari sembilan struktur yang terikat polipeptida, dimana FGF-1 (*acidic* FGF) dan FGF-2 (*basic* FGF) yang paling banyak dipelajari. Keduanya disekresi tanpa adanya urutan signal, dikeluarkan dari sel tanpa mempengaruhi integritas sel atau membutuhkan kematian sel, kemungkinan mengikuti jalur *synaptotagmin-1-dependent exocytotic* non klasikal (La Vallee *et al.*, 1998). *Basic fibroblast growth factor* (bFGF) atau disebut juga FGF-2 adalah suatu polipeptida yang menginduksi proliferasi, migrasi dan produksi protease pada kultur endothelial sel dan neovaskularisasi *in vivo* (Ribatti *et al.*, 2002). Efek seluler dari FGF diperantarai melalui ikatan spesifik pada reseptor tirosin kinase afinitas tinggi. Dimerisasi reseptor oleh FGF difasilitasi oleh heparin, ini dihasilkan pada aktivasi protein kinase dan autofosforilasi reseptor (Klein *et al.*, 1997 *cit* Griffioen and Molema, 2000).

3) *Angiopoietin-1*

Ang-1 secara endogen mengeluarkan glikoprotein sekitar 75 kDa. Reseptornya (Tie2) biasanya terbatas pada endotelium dan merupakan faktor penting pada angiogenesis selama masa perkembangan, pertumbuhan tumor dan penyembuhan luka (Sato *et al.*, 1995 *cit* Griffioen and Molema, 2000). Secara *in vitro*, Ang-1 merangsang fosforilasi tirosin dari Tie-2 pada sel endotelial, menghambat starvasi serum-meningkatkan apoptosis sel, meningkatkan percabangan angiogenesis dan menstabilkan organisasi jaringan HUVEC (Korpelainen and Alitalo, 1998 *cit* Griffioen and Molema, 2000).

2) Inhibitor angiogenesis

Penelitian tentang inhibitor angiogenesis menimbulkan pertanyaan apakah molekul ini dapat digunakan sebagai terapi yang menghambat atau menekan pertumbuhan kanker. Beberapa inhibitor angiogenesis, antara lain; angiostatin, endostatin, interferon, faktor platelet 4, fragmen prolaktin 16 Kd, thrombospondin, TIMP-1, TIMP-2 dan TIMP-3 (Kleinsmith *et al.*, 1999).

4. Pengobatan kanker dan angiogenesis

Kemoterapi yang digunakan saat ini untuk kanker ialah sitostatika yang hanya menyebabkan pemusnahan atau perusakan sel tumor. Umumnya kerja obat ini kurang spesifik sehingga pada saat yang sama akan menimbulkan kerusakan yang parah (Mutschler, 1991). Pengobatan menggunakan senyawa antiangiogenesis merupakan pendekatan baru dalam terapi kanker. Dalam hal ini kerja antiangiogenesis adalah dengan menghambat pembentukan pembuluh darah baru yang mensuplai kebutuhan makanan sel kanker dan sebagai jalur keluarnya sel kanker menuju sirkulasi sistemik (Anonim, 2000).

Saat ini, ada dua paradigma tentang proses vaskuler yang berlaku dalam neovaskularisasi oleh tumor. Selama pembentukan pembuluh darah baru, tumor pada awalnya memanfaatkan aliran darah inang untuk hidup, bersamaan dengan ini terjadi regresi aliran darah dari inang. Setelah itu, pertumbuhan sel tumor yang berlanjut akan mengarah pada inisiasi dari angiogenesis (Holash *et al.*, 1999 *cit* Griffioen and Molema, 2000). Selain itu, sirkulasi sel asal endotelial dapat

membentuk suatu sumber tambahan untuk *vasculogenesis postnatal* pada pertumbuhan tumor (Asahara *et al.*, 1999).

Studi terbaru menunjukkan bahwa penyakit proliferasi limfoid seperti leukemia dan limfoma juga bergantung pada angiogenesis. Peningkatan ekspresi dari FGF dan VEGF telah diamati pada leukemia myeloid akut, leukemia limfoblastoma akut dan limfoma (Fiedler *et al.*, 1997 cit Griffioen and Molema, 2000; PerezAtayde *et al.*, 1997).

Kebanyakan pendekatan untuk mengatur angiogenesis difokuskan pada fungsi dari endotelial selama pembentukan pembuluh darah (jalur penghambatan angiogenesis), yaitu melalui:

1) Intervensi dari pertumbuhan sel endotelial

Pendekatan tersukses untuk mengatur angiogenesis saat ini adalah dengan menggunakan agen spesifik yang menghambat pertumbuhan dari sel endotelial.

Contoh:

- a) Senyawa yang secara langsung menghambat pertumbuhan sel endotelial, antara lain; *AGM-1470 / TNP-470* (Kusaka *et al.*, 1991), *Thrombospondin-1* (Grossfeld *et al.*, 1997), *Platelet factor-4* (Gupta *et al.*, 1995), *Interferon-inducible protein-10* (Luster *et al.*, 1995), *Angiostatin* (O'Reilly *et al.*, 1994), *Endostatin* (O'Reilly *et al.*, 1994 cit Griffioen and Molema, 2000), *Vasostatin* (Pike *et al.*, 1998), *Restin* (Ramchandran *et al.*, 1999 cit Griffioen and Molema, 2000).
- b) Senyawa yang menghambat faktor angiogenik (VEGF, FGF, dll) dan reseptornya, antara lain; *SU5416* yaitu suatu inhibitor spesifik dari fosforilasi *VEGFR-2* (Fong *et al.*, 1999).
- c) Senyawa yang menghambat motilitas sel tumor, antara lain; *Carboxyamidotriazole* (CAI) yaitu dengan menghambat influks kalsium transmembran (Kohn *et al.*, 1995).

2) Intervensi dari adhesi dan migrasi sel endotelial

Karena proses angiogenesis juga tergantung pada adhesi sel endotelial dan migrasi sel melewati matriks ekstraseluler, maka dilakukan penelitian untuk mencari modulator dari interaksi ini.

Contoh: Interferon α dan β , yaitu dengan menghambat migrasi dari sel endotelial kapiler (Sidky and Borden, 1987).

3) Intervensi dari metaloproteinase

Menggunakan inhibitor spesifik dari proteinase yang dapat memutus jaringan penghubung yang mendukung migrasi sel endotelial dan pembentukan pembuluh darah selanjutnya. Matriks metaloproteinase adalah sejenis enzim yang terlibat dalam perubahan bentuk (*remodeling*) jaringan dan *morphogenesis*. Secara bersama, enzim ini dapat mendegradasi seluruh komponen dari matriks ekstraseluler (Rasmussen and McCann, 1997).

Peningkatan aktivitas dari enzim ini telah diamati pada pembentukan tumor, oleh karena itu inhibitor dari MMP merupakan pendekatan yang menarik pada pengobatan kanker. Inhibitor MMP dapat dibagi menjadi inhibitor protease sintetik dan inhibitor MMP alami, suatu penghambat jaringan dari metaloproteinase.

Contoh:

a) Sintetik, yaitu dengan menurunkan penyebaran dan pertumbuhan beberapa maligna, antara lain; Batimastat, Marimastat dan Prinomastat / AG 3340 (Shalinsky *et al.*, 1999).

b) Alami, yaitu dengan menghalangi aktivitas kolagenolitik penghubung sel, antara lain; PEX (Brooks *et al.*, 1998).

Percobaan klinis dari inhibitor angiogenesis pada pengobatan kanker, yaitu:

1) Obat yang menghambat proliferasi sel endotelial secara langsung.

Contoh: TNP-470 (Stadler *et al.*, 1998 *cit* Griffioen and Molema, 2000).

2) Obat yang memblok pengrusakan matriks.

Contoh: Inhibitor metalloproteinase (batimastat, manimastat, prinomastat /Ag3340) (Shalinsky *et al.*, 1999).

3) Obat yang menghambat integrin spesifik-endotelial/signal kelangsungan hidup.

Contoh: Vitaxin (Gutheil *et al.*, 1998 *cit* Griffioen and Molema, 2000).

4) Obat dengan mekanisme aksi spesifik-sel nonendotelial.

Contoh : CAI (suatu inhibitor influks kalsium transmembran) (Kohn *et al.*, 1997 *cit* Griffioen and Molema, 2000).

5) Obat yang memblokir aktivator dari angiogenesis.

Contoh :

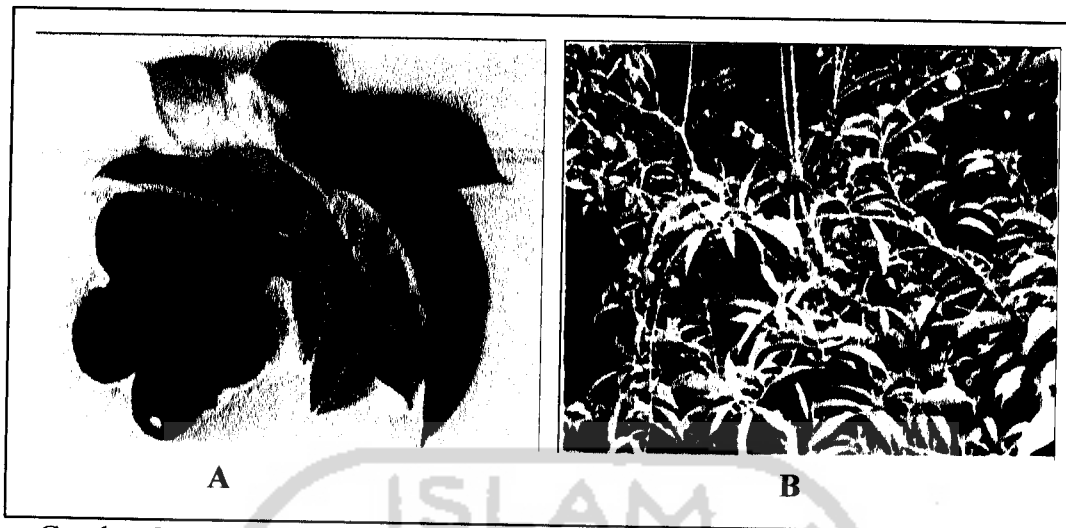
a) SU5416 ; inhibitor spesifik jalur signal dari VEGFR-2.

b) SU6668 ; inhibitor spektrum luas, mengganggu reseptor dari VEGF, FGF dan PDGF (Koch *et al.*, 1995 *cit* Griffioen and Molema, 2000).

Tabel I. Perbandingan aplikasi klinik antara kemoterapi sitotoksik dan terapi angiogenesis (Brem, 1999).

	Kemoterapi sitotoksik	Antiangiogenesis sitostatik
Onset	Cepat	Lebih lambat
Target respon sel tumor	Berkurangnya volume tumor	Waktu perkembangan / waktu untuk bertahan hidup
Toksitas	Signifikan (anemia, leukopenia, gastrointestinal, imunologikal, <i>alpecia</i>)	Ringan dan dapat ditoleransi dengan baik, penundaan penyembuhan luka, infertilitas
Terapi kombinasi	Beberapa agen seringkali digunakan sebagai penghubung terapi pembedahan dan terapi radiasi	Sinergis dengan antiangiogenik lain, terapi radiasi, kemoterapi sitotoksik, dan sebagai tambahan dalam pembedahan <i>cytoreductive</i> untuk mencegah kekambuhan
Target molekuler	<i>Single</i> atau <i>multiple</i>	<i>Single</i> atau <i>multiple</i> . Panstasis mungkin diharapkan karena " <i>biochemical redundancy</i> " pada pengontrolan angiogenesis
<i>Staging</i>	Pemilihan terapi ditentukan organ target dan klasifikasi TNM	Terapi antiangiogenesis tergantung pada tingkat dan ukuran (pencegahan untuk penyakit mikroskopik, intervensi untuk tumor kecil, tambahan untuk yang besar, tumor stadium akhir). Spesifikasi organ tidak ada.

5. Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) Boerl.



Gambar 2. Foto tanaman mahkota dewa; A. Buah berwarna merah dan daun berwarna hijau; B. Pohon mahkota dewa

a. Klasifikasi tanaman

- Sinonim : *Phaleria papuana* Warb var. *Wichnannii* (Val) Back.
 Divisi : Spermatophyta.
 Subdivisi : Angiospermae.
 Kelas : Dicotyledoneae.
 Bangsa : Thymelaeales.
 Suku : Thymelaeaceae.
 Marga : *Phaleria*.
 Spesies : *Phaleria macrocarpa* (Schiff) Boerl atau *Phaleria papuana* Warb var. *Wichnannii* (Val) Back (Winarto, 2004).



b. Morfologi tanaman

Habitus: Perdu, menahun, tegak, tinggi 1-2,5 m.

Batang : Bulat, percabangan simpodial, permukaan kasar, coklat.

Daun : Tunggal, berhadapan, tangkai bulat, panjang 3-5 mm, hijau, helaian daun bentuk lanset atau lonjong, ujung dan pangkal runcing, tepi rata, panjang 7-10 cm, lebar 2,5 cm, pertulangan menyirip, permukaan licin, hijau.

Bunga : Majemuk, tersebar, dibatang atau ketiak daun, tersusun dalam kelompok

2-4 bunga, tanpa kelopak bunga, berkelamin ganda, benang sari melekat pada mahkota, putik keluar dari tabung mahkota, panjang 2-2,5 cm, putih, dasar mahkota bentuk tabung, ujung lepas, 4 helai, panjang 1,5-2 cm, putih.

Buah : Tunggal, bentuk bulat atau bulat telur, panjang 4-6 cm, diameter 3-5 cm, permukaan licin, beralur, warna merah.

Biji : Bulat, keras, warna coklat.

Akar : Tunggang, kuning kecoklatan (Mahendra, 2005).

c. Nama daerah

Mahkota dewa, simalakama (Sumatera/Melayu) atau makuto dewo (Jawa) (Winarto, 2004).

d. Habitat dan penyebaran

Umumnya dibudidayakan sebagai tanaman hias atau tanaman peneduh. Tumbuh baik di tanah yang gembur dengan kandungan bahan organik yang tinggi, pada ketinggian 10-1200 m dpl. Berbunga pada bulan April-Agustus. Panen sebaiknya dilakukan pada bulan Juli-September (Anonim, 1999).

e. Bagian yang digunakan

Bagian tanaman mahkota dewa yang sering digunakan adalah buahnya. Buah yang dipanen adalah buah yang sudah benar-benar matang dan sehat atau tidak terkena penyakit. Cirinya tampak segar, tidak memiliki cacat sekecil apapun, dan berwarna merah marun. Beberapa bagian tanaman mahkota dewa yang mempunyai khasiat untuk obat perlu dilakukan perlakuan khusus sebelum dikonsumsi. Perlakuan itu adalah penyortiran, pemotongan, pengeringan, penyangraian, dan perebusan (Mahendra, 2005).

f. Kandungan kimia

Bagian tanaman mahkota dewa yang berkhasiat obat adalah daging buahnya. Kandungan buah mahkota dewa terdiri dari golongan alkaloid, tanin, flavanoid, fenol, saponin, lignan, minyak atsiri dan sterol. Senyawa lignan baru

yang terdapat pada ekstrak daging buah mahkota dewa berfungsi sebagai antikanker dan antioksidan (Mahendra, 2005).

g. Manfaat tanaman

Mahkota dewa dipercaya dapat mencegah dan membantu proses penyembuhan berbagai macam penyakit antara lain; tekanan darah tinggi, meningkatkan vitalitas bagi penderita diabetes, kanker, asam urat, lever, alergi, ginjal, jantung, berbagai macam penyakit kulit, mengatasi ketergantungan obat, rematik, meningkatkan stamina dan ketahanan terhadap influenza, dan insomnia (Mahendra, 2005).

6. Membran korio alantois (CAM) dan perkembangan embrio ayam

Telur ayam terdiri dari sebuah sel reproduktif seperti pada mamalia. Pada ayam, sel tersebut dikelilingi oleh kuning telur (*yolk*), albumen, membran kerabang dan kutikula. Sebagian besar telur berbentuk oval, bentuk telur secara umum dikarenakan faktor genetis. Setiap induk bertelur berturutan dengan bentuk yang sama, yaitu bulat, panjang, lonjong dan sebagainya.

Tabel II. Spesifikasi telur standar (Suprijatna *et al.*, 2005).

Parameter	Ukuran
Bobot (ons)	2,0
Bobot (g)	56,7
Volume (cm ³)	63,0
Gravitas khusus	1,09
Panjang keliling (cm)	15,7
Lebar keliling (cm)	13,7
Indeks bentuk	74,0
Luas permukaan (cm ²)	68,0

Penyerapan zat-zat makanan dan metabolisme selama perkembangan embrio dalam telur dapat berlangsung karena adanya membran ekstraembrional. Terdapat empat membran ekstraembrional yang memiliki peranan penting selama perkembangan embrional. Membran tersebut yaitu *amnion*, *chorion*, *yolk sac* dan *allantois* (Suprijatna *et al.*, 2005).

Alantois, membran ini menyelimuti embrio dan berperan sebagai suatu sistem sirkulasi. Alantois terbentuk dari lapisan endoderma dan mesoderma splanchnis ekstra embrional. Dalam perkembangannya akan bergabung dengan

korion membentuk membran korio alantois. Membran yang sangat kaya dengan pembuluh darah ini berhubungan dengan sirkulasi embrionik melalui arteri dan vena alantois (Suprijatna *et al.*, 2005).

Fungsi dari membran alantois sebagai berikut:

- 1) Respirasi, yaitu mengalirkan oksigen ke dalam darah embrio dan mengeluarkan karbon dioksida.
- 2) Digestif, yaitu membantu digesti albumen dan absorpsi kalsium dari cangkang.
- 3) Ekskresi, yaitu membuang hasil ekskresi dari ginjal embrio dan menampungnya di rongga alantois. Alantois berkembang pada hari ketiga dan perkembangan secara lengkap terjadi pada hari ke-12 (Suprijatna *et al.*, 2005).

CAM dapat digunakan sebagai salah satu metode untuk mempelajari respon angiogenesis terhadap implan jaringan tumor. *Gelatin sponge*, sebagai bahan pembawa yang diimplantasikan pada CAM dapat digunakan untuk mengkuantifikasi angiogenesis dan antiangiogenesis pada CAM. Telur ayam berembrio untuk uji respon angiogenesis baru dapat dipergunakan setelah terbentuknya CAM pada hari ke-4 dan implantasi ke dalam CAM dapat dilakukan pada telur berembrio umur 5-16 hari (Ribatti *et al.*, 2002).

Tabel III. Tahapan Perkembangan Embrio Ayam (Suprijatna *et al.*, 2005).

Periode	Tahap Perkembangan
Telur dalam tubuh induk	Fertilisasi, pembelahan sel, pertumbuhan sel hidup, dan segregasi sel menjadi kelompok-kelompok yang berfungsi khusus
Telur diluar tubuh induk sebelum ditetaskan	Tidak berkembang, embrio dalam keadaan hidup inaktif
Selama penetasan :	
Hari ke-1	
16 jam	Tanda pertama perkembangan embrio
18 jam	Tampak saluran pencernaan
20 jam	Tampak <i>vertebral column</i>
21 jam	Pertama pembentukan sistem saraf
22 jam	Pertama pembentukan kepala
23 jam	Tampak butir-butir darah dan sistem sirkulasi
24 jam	Mulai pembentukan mata

Tabel III. (lanjutan)

Hari ke-2	
25 jam	Mulai pembentukan hati
35 jam	Mulai pembentukan telinga
42 jam	Jantung mulai berdenyut
Hari ke-3	
50 jam	Mulai pembentukan amnion
60 jam	Mulai pembentukan nasal
62 jam	Mulai pembentukan kaki
64 jam	Mulai pembentukan sayap
70 jam	Mulai pembentukan alantois
Hari ke-4	Mulai pembentukan lidah
Hari ke-5	Mulai pembentukan organ reproduksi dan <i>diferensiasi sex</i>
Hari ke-6	Mulai pembentukan paruh dan gigi
Hari ke-8	Mulai pembentukan bulu
Hari ke-10	Mulai pengerasan paruh
Hari ke-13	Penampakan sisik dan kuku
Hari ke-14	Embrio memutar kepalanya ke arah ujung tumpul telur
Hari ke-16	Sisik, kuku dan paruh menjadi halus dan keras
Hari ke-17	Paruh memutar ke arah rongga udara
Hari ke-19	<i>Yolk sac</i> mulai memasuki rongga tubuh
Hari ke-20	<i>Yolk sac</i> seluruhnya masuk rongga tubuh; embrio memenuhi semua ruang dalam telur, kecuali rongga udara
Hari ke-21	Telur menetas

Perkembangan embrio akan mengalami istirahat, tidak berkembang pada kondisi temperatur tertentu, yaitu yang disebut sebagai *physiological zero*. Temperatur tersebut adalah 75 °F (23,6 °C), di atas temperatur tersebut embrio akan berkembang. Telur ayam akan menetas pada penetasan buatan (menggunakan mesin tetas) bila tersedia temperatur sekitar 95-105 °F (35-40,5 °C). Penelitian menunjukkan bahwa di antara temperatur tersebut terdapat temperatur optimal, dimana dihasilkan perkembangan embrio terbaik. Pada 19 hari pertama penetasan, temperatur optimal lebih tinggi (99,5 °F atau 37,4 °C) dibandingkan dua hari terakhir penetasan (98-99 °F atau 36,7-37,2 °C) (Suprijatna *et al.*, 2005).

Temperatur optimal untuk perkembangan embrio tidak sama untuk semua telur, tergantung pada banyak faktor, antara lain sebagai berikut:

- 1) Besar telur.
- 2) Kualitas kerabang.

- 3) Genetis (bangsa dan strain ayam).
- 4) Umur telur.
- 5) Kelembaban udara selama penetasan (Suprijatna *et al.*, 2005).

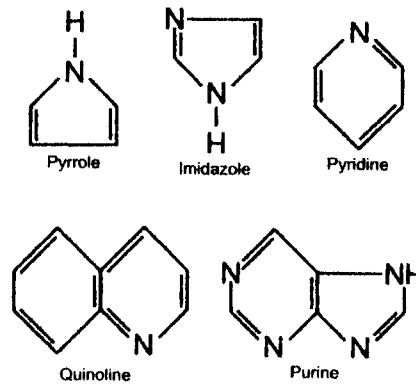
Penelitian tentang angiogenesis menggunakan metode CAM memberikan beberapa keuntungan yaitu, pada membran ini terdapat banyak pembuluh darah sehingga pengamatan terhadap angiogenesis dapat dilakukan, metodenya sederhana, dan tidak terlalu mahal.

7. Alkaloid

Alkaloid (sekitar 5500 telah diketahui), merupakan golongan zat tumbuhan sekunder yang terbesar. Tidak ada satupun istilah 'alkaloid' yang memuaskan, tetapi pada umumnya alkaloid mencakup senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam gabungan, sebagai bagian dari sistem siklik. Alkaloid sering kali beracun bagi manusia dan banyak yang mempunyai kegiatan fisiologi yang menonjol, jadi digunakan secara luas dalam bidang pengobatan. Alkaloid biasanya tidak berwarna, sering kali bersifat optis aktif, kebanyakan berbentuk kristal tetapi hanya sedikit yang berupa cairan (misalnya nikotin) pada suhu kamar (Harborne, 1987).

Prazat alkaloid yang paling umum adalah asam amino, meskipun sebenarnya biosintesis kebanyakan alkaloid lebih rumit. Secara kimia alkaloid merupakan suatu golongan heterogen. Ia berkisar dari senyawa sederhana seperti koniina (alkaloid utama *Conium maculatum*) sampai ke struktur pentasiklik seperti strikhnina (racun kulit *Strychnos*). Amina tumbuhan (misalnya meskalina), basa purina dan pirimidina (misalnya kafeina) kadang-kadang digolongkan sebagai alkaloid dalam arti umum. Banyak sekali alkaloid yang khas pada suatu suku tumbuhan atau beberapa tumbuhan sekerabat. Jadi, nama alkaloid seringkali diturunkan dari sumber tumbuhan penghasilnya (Harborne, 1987).

Alkaloid banyak digunakan dalam pengobatan antara lain sebagai antikanker, antimalaria, analgetika, antipiretika, narkotika, antihipertensi, antelmintika, antibakteri, diuretika, stimulant saraf dan lain-lain (Robbers, *et al.*, 1996).



Gambar 3. Struktur beberapa kerangka dasar alkaloid (Trease and Evans, 2002)

a. Ekstraksi alkaloid

Jaringan kering diekstraksi dengan asam asetat 10% dalam etanol, lalu dibiarkan sekurang-kurangnya empat jam. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan sampai seperempat volume asal dan alkaloid yang terkandung didalamnya diendapkan dengan meneteskan NH_4OH pekat. Endapan dikumpulkan dengan pemusingan, lalu dicuci dengan NH_4OH 1%. Sisa dilarutkan dalam etanol, kemudian diekstraksi dengan pelarut kloroform (Harborne, 1987).

b. Deteksi alkaloid

Sebagian larutan ditotolkan pada plat silika gel GF 254, dengan fase gerak kloroform : metanol : NH_4OH pekat (10 : 1 : 0,1). Deteksi adanya alkaloid pada plat dilakukan dengan pengamatan dibawah sinar UV 254, UV 366, dan sinar tampak menggunakan pereaksi penampak bercak Dragendorff_p (Harborne, 1987).

B. Landasan Teori

Pengobatan dengan memanfaatkan mahkota dewa saat ini makin dirasakan manfaatnya. Berdasarkan pengalaman beberapa pengguna obat herbal, mahkota dewa digunakan untuk pengobatan penyakit jantung, kanker, lever, diabetes melitus, darah tinggi dan penyakit kulit. Penelitian uji antiangiogenik tanaman ini merupakan dukungan terhadap penggunaannya sebagai obat anti kanker secara ilmiah di masyarakat. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa ekstrak buah mahkota dewa memiliki potensi penghambatan (*Inhibitory Concentration* = IC50) terhadap sel Hela (sel kanker rahim) sebesar 114, 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sumastuti and

Sonlimar, 2002). Alkaloid merupakan salah satu kandungan kimia dari buah mahkota dewa yang berpotensi sebagai antikanker dan dalam hal ini akan diteliti efek antiangiogeniknya

C. Hipotesis

Berdasarkan tinjauan di atas maka dapat dibuat suatu hipotesis bahwa alkaloid fraksi kloroform buah mahkota dewa mempunyai efek antiangiogenik pada membran korio alantois embrio ayam terinduksi bFGF.



BAB III METODE PENELITIAN

A. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia kering buah *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. yang diperoleh dari daerah Ngaglik, Sleman, Yogyakarta dan bahan yang digunakan untuk ekstraksi adalah asam asetat 10% dalam etanol 70%, etanol 70%, NH₄OH pekat, NH₄OH 1% dan kloroform (diperoleh dari laboratorium Biologi Farmasi FMIPA UII), deteksi dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan kloroform, metanol, NH₄OH_p, plat silika gel GF 254 dan penampak bercak Dragendorff_p. Bahan uji hambat angiogenesis terdiri dari:

- a. Induktor angiogenesis, yang digunakan adalah *recombinant human* bFGF 1 ng/μl.
- b. Membran korio alantois dari embrio ayam SPF umur 9 hari (dalam kondisi terinkubasi) dibeli dari PUSVETMA, Surabaya. Telur-telur tersebut dibeli khusus karena bersifat *Specific Pathogen Free* (SPF) yang berarti bebas dari penyakit tertentu dan tidak mempunyai antibodi terhadapnya.
- c. Bahan kimia: pelarut alkaloid ekstrak buah mahkota dewa yaitu DMSO 0,8 %, larutan buffer Tris-HCL 10 mM pH 7,5, etanol 70%, formalin 10 % dan larutan NaCl 0,9 %.
- d. Untuk pembuatan preparat histologi membran korio alantois, digunakan bahan pewarna hemaktosilin-eosin (HE).

2. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah mesin penyerbuk, alat-alat gelas, alat Soxhlet, corong pisah, *sentrifuger*, corong Buchner, timbangan analitik, penangas air, kipas angin, alat *candling*, paku kertas, *dental drill*, adaptor, karet penyedot udara, *Laminar Air Flow*, lampu spiritus, *paper disc* steril, mikrofilter steril, inkubator, kulkas, mikropipet, *skalpel*, pinset, gunting, lup, kamera, dan mikroskop binokuler.

B. Cara Penelitian

1. Identifikasi tanaman

Identifikasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi FMIPA UII dengan berdasar pada buku Flora of Java.

2. Penyerbukan simplisia kering buah mahkota dewa

Buah mahkota dewa kering diserbuk menggunakan mesin penyerbuk, kemudian ditempatkan dalam plastik bersih.

3. Ekstraksi alkaloid buah mahkota dewa

Ekstraksi alkaloid dilakukan dengan menggunakan alat Soxhlet. Serbuk mahkota dewa seberat 30 g diekstraksi menggunakan penyari berupa pelarut campuran asam asetat 10% dalam etanol 70%. Untuk setiap 30 g serbuk digunakan 150 ml penyari. Setelah cairan penyari jernih, proses ekstraksi dihentikan dan dibiarkan selama 4 jam. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan sampai seperempat volume asal dan alkaloid yang terkandung didalamnya diendapkan dengan meneteskan NH_4OH pekat. Endapan dikumpulkan dengan pemusingan dan dicuci dengan NH_4OH 1%. Kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan dalam 25 ml etanol 70%, lalu diekstraksi dengan pelarut 25 ml kloroform sebanyak 2 kali. Ekstrak tersebut selanjutnya diuapkan sampai kering diatas penangas air (Harborne, 1987).

4. Kromatografi untuk deteksi alkaloid

Ekstrak kering dilarutkan dalam beberapa tetes etanol 90 %, kemudian ditotolkan pada plat KLT silika gel GF 254. Selanjutnya plat dielusi dengan menggunakan fase gerak kloroform : metanol : NH_4OH pekat (10 : 1 : 0,1). Deteksi adanya alkaloid dilakukan dengan pengamatan bercak yang terjadi di plat dibawah lampu UV 254, UV 366 dan pada sinar tampak dengan penyemprotan menggunakan penampak bercak Dragendorf_p (Harborne, 1987).

5. Sterilisasi alat

Alat-alat yang akan digunakan dicuci bersih dengan sabun dan dikeringkan, kemudian alat untuk uji penghambatan angiogenesis dibungkus dengan kertas payung dan disterilkan dengan pemanasan basah dalam *press cooker* suhu 110 °C selama 30 menit.

6. Preparasi bFGF sebagai induktor angiogenesis

bFGF yang digunakan diambil sebanyak 25 µg, dibuat stok kadar 25 µg/ml menggunakan Tris-HCL 10mM pH 7,5 kemudian diencerkan sehingga didapat kadar 1 ng/µl. Preparasi bFGF ini dilakukan secara aseptis di dalam *laminar air flow*. Dosis bFGF yang diberikan untuk setiap telur perlakuan terinduksi adalah 10 ng.

7. Preparasi larutan uji alkaloid buah mahkota dewa

Alkaloid dari buah mahkota dewa dilarutkan dalam DMSO 0,8 % untuk kemudian dibuat seri konsentrasi, yaitu; 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml dan 400 µg/ml ekstrak. Selanjutnya larutan uji disterilkan menggunakan mikrofilter. Preparasi dilakukan secara aseptis di dalam *laminar air flow*.

8. Uji daya hambat angiogenesis

Telur ayam SPF yang telah dibeli sehari sebelumnya, umur 8 hari (inkubasi) segera diinkubasi lagi dalam inkubator laboratorium pada suhu 39° C, agar dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan barunya. Tahap awal yaitu dengan memberi tanda pada kerabang telur yang meliputi batas ruang udara, lokasi embrio dan daerah yang akan dibuat segi empat (jendela) berukuran 1x1 cm di atas embrio. Lokasi embrio diketahui melalui *candling* pada telur. Kerabang telur pada bagian kutub yang mengandung ruang udara dan kerabang di atas embrio disucihamakan dengan alkohol. Selanjutnya pada kedua daerah tersebut dibuat lubang kecil menggunakan sebuah *mini drill*.

Udara dari ruang udara diaspirasi dengan bola karet sampai berpindah dari kutub ke kerabang bagian atas telur. Perlakuan ini dilakukan dengan posisi telur horisontal, di ruang gelap, dan melalui *candling*, sehingga ruang udara buatan

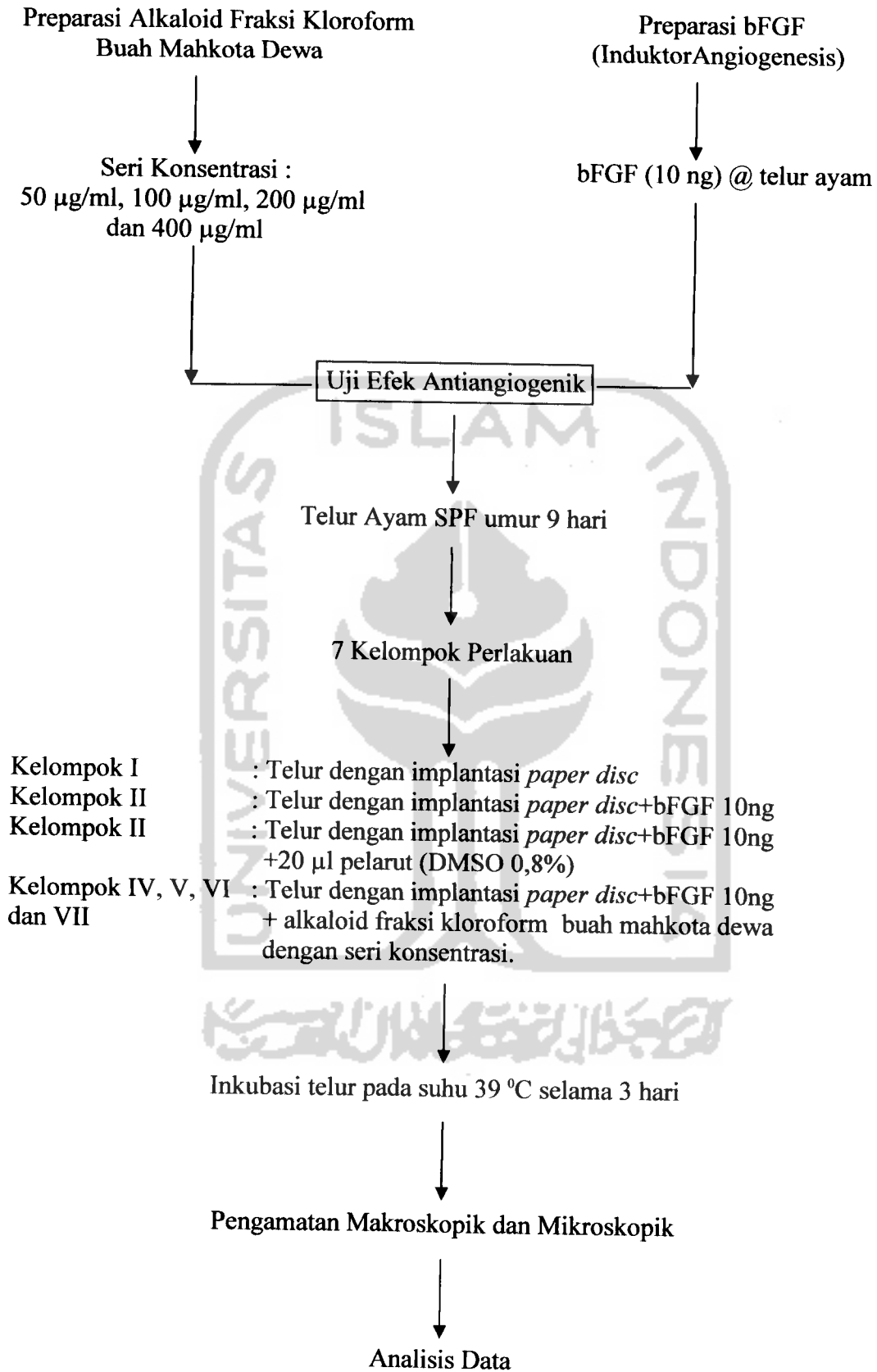
yang terbentuk di atas embrio dapat terlihat. Kerabang telur di atas embrio dipotong dengan gergaji (*mini drill*) untuk membuat lubang segi empat dengan luas 1 cm². Melalui lubang ini bFGF dan alkaloid ekstrak diimplantasi ke dalam membran korio alantois yang telah terbentuk, setelah sebelumnya telur disucihamakan lagi dan dimasukkan dalam *laminar air flow* dengan posisi horisontal dengan ruang udara buatan terletak di bagian atas. Subyek uji berupa telur dibagi dalam 7 kelompok (masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari 5 telur), sebagai berikut:

- a. kelompok I adalah telur dengan implantasi *paper disc*.
- b. kelompok II kelompok telur terinduksi adalah telur dengan implantasi *paper disc* termuati bFGF 10 ng.
- c. kelompok III kelompok kontrol bFGF+pelarut adalah kelompok telur dengan implantasi *paper disc* termuati bFGF 10 ng+pelarut (DMSO 0,8 %) sebanyak 20 µl.
- d. kelompok IV, V, VI, dan VII merupakan telur yang digunakan untuk melihat efek penghambatan alkaloid fraksi kloroform buah *Phaleria macrocarpa* Boerl. Telur pada kelompok ini diberi implantasi *paper disc* termuati bFGF 10 ng + alkaloid fraksi kloroform, dengan variasi konsentrasi 50, 100, 200 dan 400 µg/ml.

Setelah diberi perlakuan, telur diinkubasi pada suhu 39 °C dengan kelembaban relatif 60 % selama 3 hari atau 72 jam (Ribbati *et al.*, 1997). Setelah itu telur dibuka (umur 12 hari) dan isi telur dikeluarkan. Telur dibuka dengan cara menggunting cangkang telur menjadi 2 bagian dimulai dari cangkang yang dekat dengan rongga udara, setelah itu membran korio alantois yang melekat pada cangkang diamati secara makroskopik dan mikroskopik.

Pengamatan secara makroskopik dilakukan dengan bantuan lup, sedangkan pengamatan secara mikroskopik dilakukan terhadap preparat histologi dari CAM telur tersebut.

9. Skematika Penelitian.



C. Analisis Hasil

Data penelitian berupa banyaknya pembuluh darah baru atau respon angiogenesis pada CAM setelah pemberian alkaloid fraksi kloroform buah mahkota dewa. Evaluasi uji antiangiogenik secara makroskopik dilakukan dengan mengamati respon angiogenesis *hospes* secara deskriptif, dan dikuantifikasi dengan menghitung jumlah pembuluh darah baru pada *paper disc* (termuati bFGF dan alkaloid) di sekeliling *paper disc* tersebut (berpola radial).

Setiap pembuluh darah baru yang terlihat diberi nilai 1. Jumlah pembuluh darah baru terbanyak dari kelompok kontrol bFGF + pelarut DMSO 0,8 %, selanjutnya persentase pembuluh darah baru dari setiap telur perlakuan alkaloid direlatifkan terhadap persentase pembuluh darah baru rata-rata dari kelompok kontrol bFGF + pelarut DMSO 0,8 %.

Respon angiogenesis relatif tersebut digunakan untuk mengurangi 100 % sehingga diperoleh prosentase penghambatan alkaloid buah mahkota dewa. Kemudian dianalisis secara statistik menggunakan metode analisa varian satu arah Anova dengan taraf kepercayaan 95 % untuk melihat adakah perbedaan yang signifikan dalam keseluruhan kelompok, dan apabila signifikan dilanjutkan dengan metode Tukey, taraf kepercayaan 95 % untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan antar kelompok.

$$\text{Respon angiogenesis relatif} = \frac{a}{b} \times 100\%$$

a : Prosentase pembuluh darah baru perlakuan alkaloid.

b : Prosentase pembuluh darah baru rata-rata kelompok bFGF + pelarut DMSO 0,8 %.

Prosentase penghambatan

= 100% - respon angiogenesis relatif terhadap bFGF+pelarut DMSO 0,8%

Pengamatan makroskopik respon angiogenesis ini dilakukan oleh 3 (tiga) orang secara bergantian untuk mengurangi subjektifitas penilaian. Pengamatan

makroskopik respon angiogenesis yang terbentuk dilakukan untuk mengetahui jumlah pembuluh darah CAM dan membandingkannya antar kelompok dosis. Data mikroskopik yang diperoleh berupa foto preparat histologi merupakan data pendukung bagi data hasil pengamatan makroskopik.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kandungan aktif dari buah mahkota dewa yang memiliki aktivitas sebagai penghambat angiogenesis yang sangat berguna dalam pendekatan baru pada pengobatan penyakit kanker (Griffioen and Molema, 2000) dan penyakit lain yang perkembangannya dipengaruhi oleh pembentukan pembuluh darah baru atau angiogenesis (Griffioen and Molema, 2000; Folkman dan Shing, 1992). Penelitian yang telah dilakukan menggunakan ekstrak etanol buah mahkota memberikan kesimpulan bahwa buah mahkota dewa memiliki aktivitas anti angiogenik, penelitian ini merupakan kelanjutan dari penelitian sebelumnya untuk mengetahui kandungan aktif dari buah mahkota dewa yang berkhasiat sebagai anti angiogenik yaitu alkaloidnya.

A. Identifikasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Jurusan Farmasi Fakultas MIPA Universitas Islam Indonesia dengan berpedoman pada buku Flora of Java volume 1 (Backer, CA and Van Den Brink, RCB., 1965).

Determinasi tanaman:

1.b – 2.b – 3.b – 4.b – 12.b – 13.b – 14.b – 17.b – 18.b – 19.b – 20.b – 21.b – 22.b
29.b – 30.b – 31.a – 32.a – 33.a – 34.a – 35.a – 36.a – 37.b – 38.b – 39.b – 72.b –
73.b – 74.a – 75.b – 76.b – 333.b – 334.b – 335.a – 336.b – 345.b – 466.b – 467.b
– 468.b – 469.b – 550.b – 576.b – 757.b – 758.c – 774.b – 775.b – 874.b – 876.b –
937.a – 938.c – 939.a – 940.a – 941.b – 942.bThymelaeaceae.

64. Thymelaeaceae

1.aPhaleria

1. Phaleria Jack

1.a – 2.b*P. macrocarpa*(Scheff.) Boerl.

B. Preparasi Alkaloid Buah Mahkota Dewa

Daging buah mahkota dewa segar diiris tipis-tipis dan dikeringkan dalam lemari pengering. Pengeringan dimaksudkan untuk mengurangi kadar air, menghentikan reaksi enzimatik, mencegah tumbuhnya jamur/cendawan dan mempermudah proses penyarian (ekstraksi) kandungan aktif. Bahan kering yang diperoleh kemudian diserbuk dengan mesin penyerbuk agar ukuran bahan lebih

kecil dan menambah luas permukaan kontak sehingga larutan penyari lebih mudah berinteraksi dengan komponen yang akan dipisahkan.

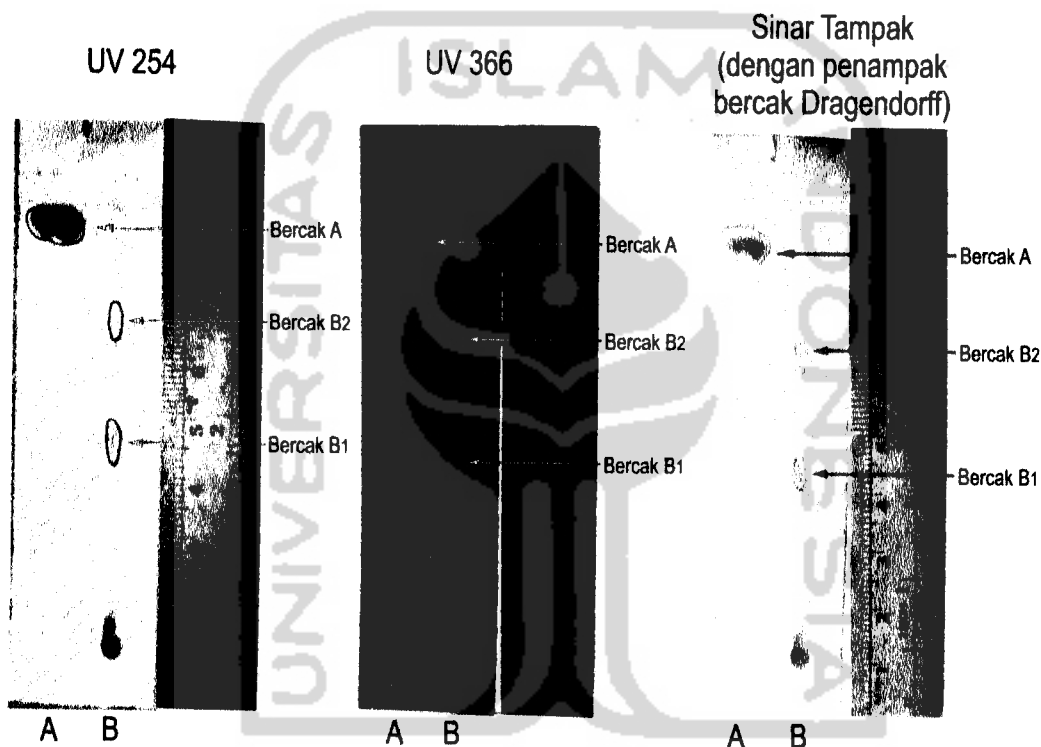
Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan alat Soxhlet karena metode ini mudah dilakukan, sederhana, menggunakan sedikit pelarut dan dapat menyari banyak zat dalam waktu yang relatif cepat. Penyarian menggunakan campuran pelarut yaitu asam asetat 10% dalam etanol 70%. Pemilihan campuran pelarut dimaksudkan untuk melarutkan alkaloid yang bersifat basa, di mana dalam larutan yang bersifat asam akan membentuk garam yang larut. Pemilihan etanol karena pelarut ini bersifat netral, tidak toksik dan dapat digunakan untuk melarutkan banyak zat. Asam asetat sebagai asam lemah dapat bereaksi dengan alkaloid yang bersifat basa lemah sehingga terbentuk garam yang larut. Ekstrak yang diperoleh kemudian ditetesi dengan NH_4OH pekat sampai terbentuk endapan. Endapan yang terjadi merupakan alkaloid yang kembali dari bentuk garam ke bentuk basanya. Endapan dikumpulkan dengan pemusingan dan dicuci dengan NH_4OH 1 %, endapan yang diperoleh kemudian dilarutkan dalam etanol 75%. Kemudian dilakukan deteksi pendahuluan adanya alkaloid dengan reaksi pengendapan menggunakan reagen Mayer dan reagen Bouchardat. Pada kedua percobaan terjadi endapan putih dengan reagen Mayer dan endapan coklat dengan reagen Bouchardat, hal ini menunjukkan kemungkinan adanya alkaloid pada larutan (Anonim,1980). Selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan pelarut kloroform. Alkaloid akan tersari kedalam kloroform, kemudian ekstrak dikeringkan. Diperoleh ekstrak kering sebanyak 0.37 gram berwarna coklat seperti karamel dari 30 gram serbuk.

C. Kromatografi Untuk Deteksi Alkaloid

Penentuan adanya alkaloid dalam ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis. Ekstrak kering yang diperoleh sebanyak 0.1 gram dilarutkan kedalam 1 ml etanol 90 %. Larutan uji yang diperoleh kemudian dianalisa secara kualitatif dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis, dengan menggunakan silika gel GF 254 sebagai fase diam dan fase gerak kloroform : metanol : NH_4OH pekat dengan perbandingan 10 : 1: 0,1. Untuk

mengetahui adanya alkaloid pada sampel uji, maka digunakan alkaloid standar piperin sebagai zat pembanding.

Larutan uji dan larutan standar piperin ditotolkan diatas plat KLT sebanyak 5 totolan, kemudian dielusikan dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan fase gerak. Plat yang digunakan berukuran 10 x 3 cm, dan jarak yang ditempuh oleh fase gerak adalah 8 cm. Setelah plat dielusikan dengan fase gerak, bercak yang terjadi pada plat kemudian diamati dibawah sinar lampu UV 254, UV 366 dan sinar tampak dimana plat disemprot dengan penampak bercak Dragendorff.



Gambar 4. Deteksi alkaloid dengan metode Kromatografi Lapis Tipis, fase diam silika gel GF 254, fase gerak kloroform:metanol: NH_4OH_p (10:1:0,1). A. Larutan Standar Piperin, B. Larutan Uji Alkaloid

Dari percobaan, setelah diamati dibawah sinar lampu UV 254 dan UV 366 diperoleh 2 noda bercak pada larutan uji alkaloid dan 1 noda bercak pada larutan standar piperin. Plat kemudian disemprot dengan penampak bercak Dragendorff yang digunakan untuk menunjukkan adanya alkaloid. Baik pada kedua noda dari larutan uji maupun noda dari larutan standar piperin memberikan warna yang sama yaitu coklat jingga. Berdasarkan hal ini maka dapat dibuktikan bahwa pada

sampel uji terdapat senyawa alkaloid. Selanjutnya bercak yang diperoleh ditentukan harga hRf nya, yaitu jarak tempuh noda dibagi jarak tempuh eluen dikalikan 100 seperti pada tabel IV.

Tabel IV. Hasil analisa KLT dengan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak kloroform : metanol : NH₄OH_p (10 : 1 : 0,1).

Larutan Uji	Bercak	hRf	Warna		
			UV 254nm	UV 366nm	Draggendorf
Piperin	A	88,75	Ungu	Abu-abu	Coklat jingga
Alkaloid Fraksi Kloroform	B1	41,25	Ungu muda	Biru	Coklat jingga
	B2	67,5	Ungu muda	Biru	Coklat jingga

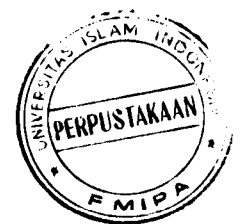
D. Uji Daya Hambat Angiogenesis

Penelitian ini merupakan penelitian secara *in vivo* menggunakan membran korio alantois telur ayam yang banyak mengandung pembuluh darah. Penelitian dilakukan dengan cara mengamati terjadinya perubahan perkembangan pembuluh darah yang disebabkan oleh faktor ekstrinsik. Metode ini pertama kali dikemukakan oleh Ribbati *et al.* (1997) yang merupakan metode pendekatan untuk mengetahui adanya perubahan-perubahan pada pembuluh darah dari membran korio alantois akibat perlakuan tertentu. Penelitian ini mengikuti metode yang sama dengan sedikit modifikasi yaitu tidak menggunakan *gelatin sponges* sebagai pembawa sediaan uji tetapi menggunakan *paper disc* steril. Modifikasi ini dikontrol dengan menambah satu variabel pada percobaan yaitu kelompok kontrol *paper disc*.

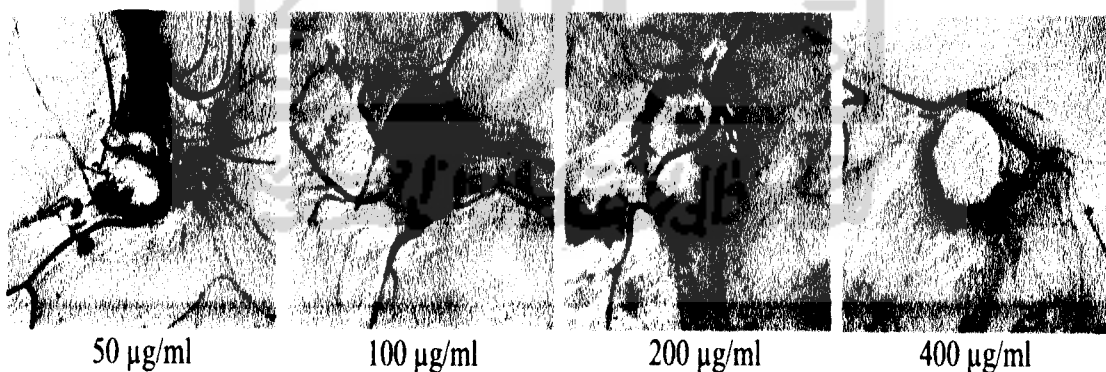
Pembuluh darah merupakan jalur transportasi yang digunakan oleh sel untuk mencukupi kebutuhannya akan oksigen dan nutrisi. Sel kanker yang pertumbuhannya cepat dan tidak terkontrol membutuhkan lebih banyak suplai oksigen dan nutrisi dibandingkan dengan sel normal. Untuk mencukupi kebutuhan ini, sel kanker akan berusaha membentuk pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang sudah ada yang dimaksudkan untuk meningkatkan suplai darah yang membawa oksigen dan nutrisi. Pembentukan pembuluh darah baru dapat terjadi dengan beberapa mekanisme, salah satunya dengan melepaskan faktor penginduksi pertumbuhan pembuluh darah. bFGF merupakan faktor penginduksi

pembuluh darah baru yang poten dan dikeluarkan oleh banyak jenis sel saat membutuhkan lebih banyak suplai oksigen dan nutrisi termasuk sel kanker yang mengalami kelaparan.

Pada percobaan ini bFGF akan menginduksi pembentukan pembuluh darah baru pada membran korio alantois, parameter terjadinya proses angiogenesis adalah bertambahnya jumlah pembuluh darah baru pada CAM yang diberi bFGF dibandingkan CAM tanpa perlakuan dengan bFGF. Dari hasil penelitian terlihat adanya peningkatan jumlah pembuluh darah seperti yang terlihat pada gambar 5.



Gambar 5. Perbandingan pembuluh darah kelompok kontrol. Jumlah pembuluh darah baru dari terkecil ke yang terbesar berturut-turut adalah; A. *paper disc*, B. *paper disc* + bFGF, C. *paper disc* + bFGF + DMSO 0,8%.



Gambar 6. Perbandingan pembuluh darah kelompok uji. Semakin besar konsentrasi larutan uji, semakin sedikit pembuluh darah baru yang terbentuk.

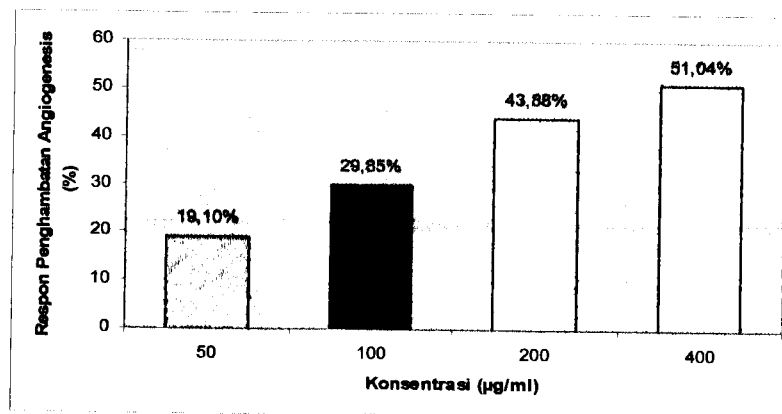
Percobaan kemudian dilanjutkan dengan menggunakan larutan uji dari ekstrak kering alkaloid fraksi kloroform buah mahkota dewa. Ekstrak kering dilarutkan dalam pelarut DMSO 0,8 % sehingga diperoleh beberapa konsentrasi larutan uji, yaitu: 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml dan 400 µg/ml. Variasi konsentrasi larutan uji dibuat disekitar IC₅₀ ekstrak buah mahkota dewa yaitu 114, 34 µg/ml (Sumastuti and Sonlimar, 2002). Jumlah pembuluh darah baru yang terbentuk berbanding terbalik dengan konsentrasi larutan uji yang digunakan. Semakin besar konsentrasi larutan uji, maka semakin sedikit jumlah pembuluh darah baru yang terbentuk, seperti terlihat pada gambar 6.

Dari hasil perhitungan yang ditunjukkan dalam tabel VI (lampiran 2), larutan uji dengan konsentrasi 50 µg/ml memberikan hasil penghambatan angiogenesis 19.1 ± 5.42 , larutan uji dengan konsentrasi 100 µg/ml memberikan penghambatan angiogenesis 29.85 ± 9.26 , larutan uji dengan konsentrasi 200 µg/ml memberikan penghambatan angiogenesis 43.88 ± 4.79 dan larutan uji dengan konsentrasi 400 µg/ml memberikan hasil penghambatan angiogenesis $51,04 \pm 6.10$. Hal ini menunjukkan adanya korelasi positif dimana peningkatan konsentrasi alkaloid akan meningkatkan penghambatan pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) pada CAM.

Tabel V. Perbandingan jumlah pembuluh darah baru antar kelompok uji dengan variasi konsentrasi dibandingkan dengan kontrol bFGF+pelarut DMSO 0,8 %.

Larutan Uji (µg/ml)	n	Jumlah Pembuluh Darah Baru (%)
50	5	$54,2 \pm 3,63$
100	5	$47,0 \pm 6,20$
200	5	$37,6 \pm 3,21$
400	5	$32,8 \pm 4,09$

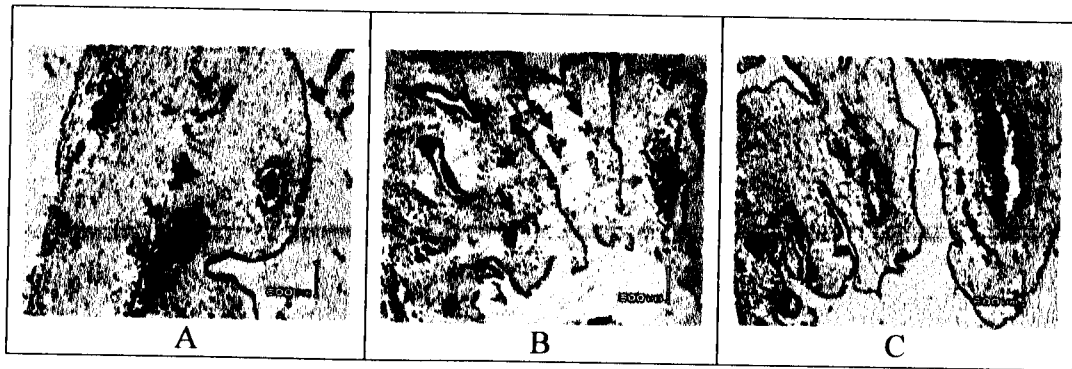
Pada tabel V terlihat adanya penurunan jumlah pembuluh darah baru yang terbentuk berdasarkan peningkatan kadar alkaloid yang diberikan. Kondisi ini menunjukkan bahwa peningkatan kadar alkaloid akan meningkatkan daya hambat pembentukan pembuluh darah baru (Gambar 7).



Gambar 7. Grafik perbandingan penghambatan angiogenesis antar kelompok uji dengan variasi konsentrasi.

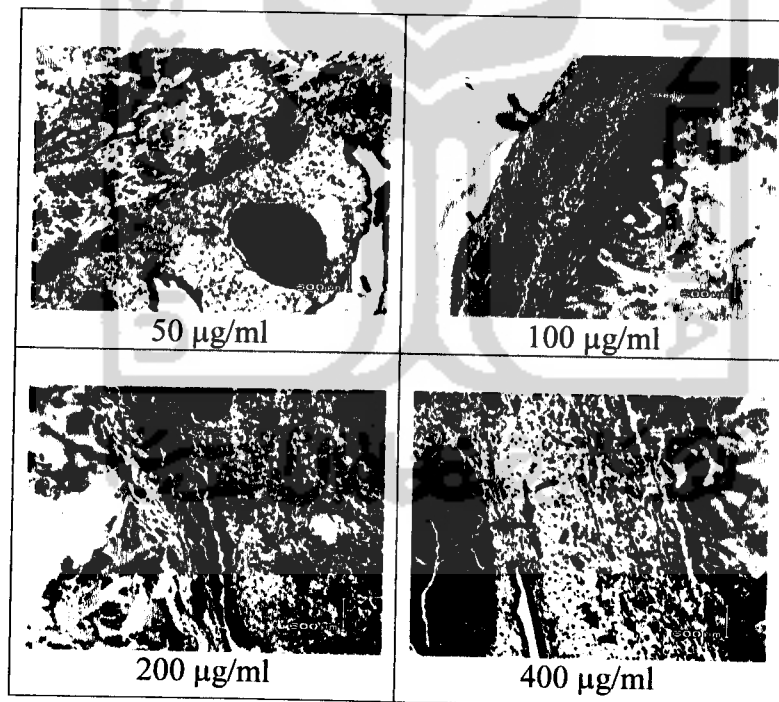
Data yang diperoleh kemudian diuji statistik menggunakan analisis satu arah Anova dilanjutkan dengan uji Tukey untuk melihat adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan. Hasil uji statistik (lampiran 3) menunjukkan perbedaan yang bermakna dari semua kelompok uji dengan kontrol yang digunakan. Perbedaan yang tidak bermakna terjadi pada kelompok perlakuan dengan konsentrasi 50 µg/ml dengan kelompok perlakuan konsentrasi 100 µg/ml, serta kelompok perlakuan dengan konsentrasi 200 µg/ml dengan kelompok perlakuan konsentrasi 400 µg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi 50 µg/ml dengan 100 µg/ml ekstrak dan konsentrasi 200 µg/ml dengan konsentrasi 400 µg/ml memiliki potensi yang sama dalam menghambat pertumbuhan pembuluh darah baru

Untuk mendukung data kuantitatif penghambatan angiogenesis yang diperoleh, diambil data kuantitatif dengan melakukan pengamatan secara mikroskopik pada preparat histologi dari membran korio alantois yang diuji. Pengamatan dilakukan pada 7 preparat kelompok uji dengan pengecatan hemaktosilin-eosin. Dari gambar 8, terlihat adanya pembuluh darah baru disamping pembuluh darah utama. Pembuluh darah baru yang terbentuk terlihat lebih banyak pada kelompok kontrol *paper disc* + bFGF dibandingkan pada kelompok kontrol *paperdisc* maupun *paperdisc* + bFGF + DMSO 0,8 %.



Gambar 8. Hasil pengamatan histologi kontrol dengan pengecatan hemaktosilin-eosin; A. Kontrol *paper disc*, B. Kontrol *paper disc* + bFGF, C. Kontrol *paper disc* + bFGF + DMSO 0,8%, Tanda panah (\rightarrow) menunjukkan pembuluh darah utama (asal), dan (\rightarrow) pembuluh darah baru yang terbentuk.

Pada gambar 9 terlihat perbedaan jumlah pembuluh darah baru dari membran korio alantois pada masing-masing kelompok uji. Jumlah pembuluh darah baru yang terlihat berbanding terbalik dengan konsentrasi ekstrak yang diuji. Semakin besar konsentrasi ekstrak yang digunakan, maka jumlah pembuluh darah baru yang terlihat semakin sedikit.



Gambar 9. Hasil pengamatan histologi dari beberapa variasi konsentrasi larutan uji. Tanda panah (\rightarrow) menunjukkan pembuluh darah utama (asal), dan (\rightarrow) pembuluh darah baru yang terbentuk.

Adanya penghambatan pembentukan pembuluh darah baru pada uji ini didukung oleh penelitian sebelumnya tentang efek antiangiogenik ekstrak etanol buah mahkota dewa (Triastuti *et al.*, 2006). Ada beberapa kemungkinan mekanisme penghambatan pembentukan pembuluh darah baru yang dilakukan alkaloid berdasarkan pada beberapa aktifitas biologisnya. Salah satu alkaloid yang sudah diteliti adalah halofuginone yaitu alkaloid golongan quinazolinone, bekerja dengan menghambat kolagen $\alpha 1(I)$ and matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). Halofuginone juga aktif menekan pertumbuhan tumor dan metastasis pada tikus (Elkin *et al.*, 2000). Senyawa golongan alkaloid telah banyak diuji secara ilmiah, baik in vitro maupun in vivo, dan terbukti memiliki aktivitas yang luas secara farmakologi.

Hasil penelitian ini hanya ditujukan untuk mengetahui adanya kemampuan dari alkaloid fraksi kloroform buah mahkota dewa dalam menghambat pembentukan pembuluh darah baru, sedangkan untuk mengetahui lebih lanjut alkaloid apa yang terdapat dalam buah mahkota dewa dan bagaimana mekanismenya dalam penghambatan angiogenesis masih memerlukan penelitian lebih lanjut. Senyawa alkaloid yang terkandung dalam buah mahkota dewa memiliki potensi yang besar untuk dikembangkan sebagai obat pada terapi penyakit proangiogenesis, seperti: kanker, inflamasi kronis, retinopati diabetes dan lain-lain.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat ditarik kesimpulan bahwa alkaloid fraksi kloroform dari buah mahkota dewa memiliki aktivitas anti angiogenik. Respon penghambatan angiogenesis masing-masing konsentrasi ekstrak adalah 19.1 % untuk konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$, 29.85 % untuk konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$, 43.88 % untuk konsentrasi 200 $\mu\text{g/ml}$ dan 51.04 % untuk konsentrasi 400 $\mu\text{g/ml}$. Semakin besar konsentrasi yang digunakan, semakin besar pula respon penghambatan angiogenesis yang dihasilkan.

B. Saran

Perlu adanya penelitian lanjutan untuk mengisolasi alkaloid dari buah mahkota dewa sehingga diperoleh beberapa alkaloid tunggal yang murni. Kemudian alkaloid yang diperoleh dapat diujikan lebih lanjut dengan metode CAM untuk mengetahui jenis alkaloid yang paling berpotensi sebagai bahan anti angiogenik.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Roberts, K., Watson, J.D., 1994, *Molecular Biology Of The Cell*, Third ed, 1255, 1269, 1270, 1282, 1283, Garland Publ Inc, NY and London.
- Anonim, 1980, *Materia Medika Indonesia*, Jilid IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 166.
- Anonim, 1996, *Medical Treatments*, Springhouse Corp, buku II, alih bahasa dr. Dini Adityarini, Penerbit PT. Gramedia, Jakarta, 470-480.
- Anonim, 1999, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia V*, Depkes Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta, 97.
- Anonim, 2000, *Understanding Angiogenesis*, available at <http://www.angio.org/understanding/understanding.html>, (diakses 13 Mei 2005).
- Asahara T., Chen D., Takahashi T., Fujikawa K., Kearney M., Magner M., Yancopoulos GD and Isner JM., 1998, Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res.*, 83:233–240.
- Asahara T., Masuda H., Takahashi T., Kalka C., Pastore C., Silver M., Kearne M., Magner M and Isner JM, 1999, Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization, *Circ Res.*, 85:221–228.
- Backer, CA and Van Den Brink, RCB., 1965, *Flora of Java (Spermatophytes only)* vol 1, N.V.P. Noordhoff, Groninger, The Netherlands.
- Bosman, FT., 1999, *Aspek-Aspek Fundamental Kanker, in vonde Velde*, C.J.H, Bosman, F.T., Wagner D.J. (Eds), *Onkologi*, diterjemahkan oleh Arjuno, Ed. V, Panitia Kanker RSUP DR Sardjito, Yogyakarta, 3-35.
- Brem, Steven, MD., 1999, *Angiogenesis And Cancer Control: From Concept To Therapeutic Trial*, *Moffitt Cancer Center & Research Institute*, available at <http://www.moffitt.usf.edu>, (diakses 10 September 2005).
- Brooks PC., Silletti S., von Schalscha TL., Friedlander M., Cheresch DA., 1998, Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity, *Cell.*, 92(3):391-400.

- Brown LF., Detmar M., Claffey K., Nagy JA., Feng D., Dvorak AM and Dvorak HF., 1997, Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A multifunctional angiogenic cytokine, *EXS*, 79:233–269.
- Carlos TM and Harlan JM., 1994, Leukocyte-endothelial adhesion molecules, *Blood*, 84:2068–2101.
- Czubayko F., Liaudet Coopman ED., Aigner A., Tuveson AT., Berchem GJ and Wellstein A., 1997, A secreted FGF-binding protein can serve as the angiogenic switch in human cancer, *Nat Med*, 3:1137–1140.
- Elkin M., Miao HQ., Nagler A., Aingorn E., Reich R., Hemo I., Dou HL., Pines M and Vlodavsky I., 2000, Halofuginone: a potent inhibitor of critical steps in angiogenesis progression, *The FASEB Journal*, 2000;14:2477-2485.
- Folkman, Judah., Shing, Yuen., 1992, Angiogenesis, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 267, No. 16, Issue of June 5. pp. 10931-10934
- Fong TA, Shawver L K, Sun L, Tang C, AH, Powell T J, Kim Y H, Schreck R, Wang X, Risau W, Ullrich A, Hirth K P and McMahon G , 1999, SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types, *Cancer Res*, 59: 99–106.
- Giavazzi, R., Albini, A., Bussolino, F., DeBraud, F., Presta, M., Ziche, M., Costa, A., 2000, The biological basis for antiangiogenic therapy (meeting report), *European Journal of Cancer*, 36: 1913-1918.
- Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP, Bochner BH, Esrig D, Groshen S, Dunn M, Nichols PW, Taylor CR, Skinner DG and Cote RJ , 1997, Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: Association with P53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression, *J Natl Cancer Inst*, 89:219–227.
- Griffioen, AW and Molema, G, 2000, Angiogenesis: Potentials for Pharmacologic Intervention in The Treatment of Cancer, Cardiovascular Disease, and Chronic Inflammation, *PR*, 52: 237-268.
- Gupta SK, Hassel T and Singh JP , 1995, A potent inhibitor of endothelial cell proliferation is generated by proteolytic cleavage of the chemokine platelet factor 4, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92:7799–7803.
- Guo Ming and Hay, B.A., 1999, Cell Proliferation And Apoptosis, *Curr Opin Cell Biol*. 11: 742-752.
- Hanahan, D and Weinberg, R.A., 2000, The Hallmark of Cancer, *Cell*, 100:57-68.

- Harborne, J.B, 1987, *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Edisi Kedua, Penerbit ITB, Bandung, 234-240.
- Harrison, 2000, *Prinsip-prinsip Ilmu Penyakit Dalam Vol.4 E/13*, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, 2017-2030.
- Hirschi KK and D'Amore PA , 1997, Control of angiogenesis by the pericyte: Molecular mechanisms and significance, *EXS.*, 79:419–428.
- Jonca F, Ortega N, Gleizes PE, Bertrand N and Plouet J , 1997, Cell release of bioactive fibroblast growth factor 2 by exon 6-encoded sequence of vascular endothelial growth factor, *J Biol Chem.*, 272:24203–24209.
- Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M and Alitalo K , 1995, Expression of the Fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92:3566–3570.
- Kanda S, Landgren E, Ljungstrom M and Claesson Welsh L , 1996, Fibroblast growth factor receptor 1-induced differentiation of endothelial cell line established from TsA58 large T transgenic mice, *Cell Growth Differ.*, 7:383–395.
- Kanda S, Hodgkin MN, Woodfield RJ, Wakelam MJ, Thomas G and Claesson Welsh L , 1997, Phosphatidylinositol 39-kinase-independent P70 S6 kinase activation by fibroblast growth factor receptor-1 is important for proliferation but not differentiation of endothelial cells, *J Biol Chem.*, 272:23347–23353.
- Kleinsmith, L.J, Kerrigan, D, Kelly., 1999, *Angiogenesis*, available at <http://press2.nci.nih.gov/sciencebehing/angiogenesis/angio00.html>, (diakses 15 Agustus 2005).
- Kohn EC, Alessandro R, Spoonster J, Wersto RP and Liotta LA , 1995, Angiogenesis: Role of calcium-mediated signal transduction, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92:1307–1311
- Kusaka M, Sudo K, Fujita T, Marui S, Itoh F, Ingber D and Folkman J , 1991, Potent anti-angiogenic action of AGM-1470: Comparison to the fumagillin parent, *Biochem Biophys Res Commun.*, 174:1070–1076
- La Vallee TM, Tarantini F, Gamble S, Carreira CM, Jackson A and Maciag T , 1998, Synaptotagmin-1 is required for fibroblast growth factor-1 release. *J Biol Chem.*, 273:22217–22223.

- Luster AD, Greenberg SM and Leder P , 1995, The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation, *J Exp Med.*, 182:219–231
- Mahendra, B, 2005, *13 Jenis Tanaman Obat Ampuh*, Penebar Swadaya, Jakarta, 67.
- Mutschler, E., 1991, *Dinamika Obat*, edisi V, penerbit ITB, Bandung, 701.
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH and Folkman J ,1994, Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma, *Cell.*, 79: 315–328.
- Pepper MS, Mandriota SJ, Jeltsch M, Kumar V and Alitalo K , 1998, Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C synergizes with basic fibroblast growth factor and VEGF in the induction of angiogenesis in vitro and alters endothelial cell extracellular proteolytic activity, *J Cell Physiol.*, 177:439–452.
- PerezAtayde AR, Sallan SE, Tedrow U, Connors S, Allred E and Folkman J , 1997, *Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia*, *Am J Pathol.*, 150:815–821.
- Pike SE, Yao L, Jones KD, Cherney B, Appella E, Sakaguchi K, Nakhasi H, Teruya FJ, Wirth P, Gupta G and Tosato G , 1998, Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth, *J Exp Med.*, 188:2349–2356.
- Rajotte D, Arap W, Hagedorn M, Koivunen E, Pasqualini R and Ruoslahti E , 1998, Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phase display, *J Clin Invest.*, 102:430–437.
- Rasmussen HS and McCann , 1997, Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: A review with special focus on batimastat and marimastat, *Pharmacol Ther.*, 75:69–75.
- Ribbati, D., Gulandaris, A., Bastaki, M., Vacca, A., Lurlalo, M., Roncali, L., Presta, M., 1997, New Model for Study of Angiogenesis and Antiangiogenesis in The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane; The Gelatin Sponge/Chorioallantoic Membrane Assay, *Journal of Vascular Research.*, 34; 455-463.
- Ribbati, D., Vacca, A., Presta, M., 2002, The discovery of angiogenic factors: A historical review, *General Pharmacology.*, 35:227-231.
- Robbers, JE., Speedie, MK., Tyler, VE., 1996, *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*, William & Wilkins, Baltimore, USA, 143-182.

- Rosen, Lee S., 2002, Clinical Experience With Angiogenesis Signaling Inhibitors: Focus on Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Blockers, *J Cancer Control.*, Vol: 9. No.2 Supplemen.
- Ryoho, GTK, 2001, Antitumor effect of the plant alkaloid preparation, cepharanthin, *Division of Immunology, Research Institute Miyagi Cancer Center.*, 28(2):211-5
- Schiffenbauer YS, Abramovitch R, Meir G, Nevo N, Holzinger M, Itin A, Keshet E and Neeman M , 1997, Loss of ovarian function promotes angiogenesis in human ovarian carcinoma, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 94:13203–13208.
- Schneider, A., K., 1997, *Cancer Genetik, Ennsyclopedia Of Human Biology*, Second Ed. Academi Press, 2: 311-321,.
- Shalinsky DR, Brekken J, Zou H, Bloom LA, McDermott CD, Zook S, Varki NM and Appelt K , 1999, Marked antiangiogenic and antitumor efficacy of AG3340 in chemoresistant human non-small cell lung cancer tumors: Single agent and combination chemotherapy studies, *Clin Cancer Res.*, 5:1905–1917.
- Sidky YA and Borden EC , 1987, Inhibition of angiogenesis by interferons: Effects on tumor- and lymphocyte-induced vascular responses, *Cancer Res.*, 47:5155–5161.
- Sukardja, I Dewa Gede, 2000, *Onkologi Klinik*, Airlangga University Press, Surabaya, 43-48, 75, 261-262.
- Sumastuti, R., Sonlimar, M., 2002, *Efek Sitotoksik Ekstrak Buah Dan Daun Mahkota Dewa [Phaleria Macrocarpa (Scheff) Boerl.] Terhadap Sel Hela*. Available at: <http://www.tempo.co.id/medikaarsip/122002/art3.htm> (diakses 17 Maret 2006).
- Suprijatna, E., Atmomarsono, U., Kartasudjana, R., 2005, *Ilmu Dasar Ternak Unggas Cet.1*, Penebar Swadaya, Jakarta, 36-47.
- Thurston, D.E., and Lobo, S.G.M.J., 1998, The chemotherapy of cancer, *Introduction to the principles of drug design and action*, Third ed, in Smith, H.J., (ed). Harwood Academic Publishers, Singapore, 334.
- Trease and Evans, 2002, *Pharmacognosy* , Fifteenth ed, W.B. Saunders, London, 334.

Triastuti, Asih., Tito, Fajar., Ashadi., Wibowo, Ari., Murwanti, Retno., 2006, *Efek Antiangiogenik Ekstrak Etanol Buah Mahkota Dewa (Phaleria Macrocarpa Boerl) Pada Membran Korio Alantois (CAM) Embrio Ayam Yang Terinduksi bFGF*, Cd Kompilasi Seminar Nasional TOI XXIX Penggalan, Pelestarian, Pemanfaatan Dan Pengembangan Tanaman Obat Indonesia : Sehat Alami Bersama Lidah Buaya (Aloe Vera) Dan Mahkota Dewa (*Phaleria Macrocarpa*), Solo.

Underwood, J.C.E, 1999, *Patologi Umum dan Sistemik*.Vol 1/Ed 2, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, 257-305.

Winarto,Ir.W.P, 2004, *Mahkota Dewa Budidaya dan Pemanfaatan untuk Obat*, Penebar Swadaya, Jakarta, 2-3.

Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ and Bicknell R , 1997, Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis, *J Clin Invest.*, 99:2625–2634.



**UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
JURUSAN FARMASI FMIPA UII
BAGIAN BIOLOGI FARMASI**

Alamat : Jl.Kaliurang Km 14,4 Yogyakarta
Telpon : (0274) 895920 Ext. 3033

SURAT KETERANGAN
Nomor:93/ UII/Jur Far/ det/V/2006

Yang bertanda tangan di bawah ini, Kepala Laboratorium Biologi Farmasi Jurusan Farmasi FMIPA UII menerangkan bahwa:

Nama : Ashadi
NIM : 02613135
Pada Tanggal : 11 Mei 2006

Telah mendeterminasi 1 (satu) species tanaman dengan bimbingan Dra. Iyok Budiarti, di Laboratorium Biologi Farmasi FMIPA UII.

Tanaman tersebut:

Phaleria macrocarpa (Scheff) Boerl (mahkota dewa)

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan semestinya.

Yogyakarta, 15 Mei 2006
Bagian Biologi Farmasi
Kepala



Asih Triastuti, S.F., Apt
NIP. 03.469/MP

Lampiran 2.

Tabel VI. Data kuantifikasi respon angiogenesis

Kelompok perlakuan	CAM ke-	Jumlah Pembuluh Darah Baru (%)	X ± SD (%)	Respon Angiogenesis Relatif Terhadap bFGF+Pelarut (%)	X ± SD (%)	Penghambatan Angiogenesis	X ± SD (%)
Kontrol paper disc	1	36	37.6 ± 2.61				
	2	38					
	3	40					
	4	34					
	5	40					
Kontrol bFGF	1	76	65.6 ± 9.07				
	2	72					
	3	67					
	4	54					
	5	59					
Kontrol bFGF+pelrt DMSO 0,8 %	1	68	67 ± 2				
	2	66					
	3	68					
	4	69					
	5	64					
50 µg	1	50	54.2 ± 3.63	74.63	80.9 ± 5.42	25.37	19.1 ± 5.42
	2	53		79.1		20.9	
	3	54		80.6		19.4	
	4	60		89.55		10.45	
	5	54		80.6		19.4	
100 µg	1	37	47 ± 6.20	55.22	70.15 ± 9.26	44.78	29.85 ± 9.26
	2	46		68.66		31.34	
	3	51		76.12		23.88	
	4	53		79.1		20.9	
	5	48		71.64		28.36	
200 µg	1	35	37.6 ± 3.21	52.24	56.12 ± 4.79	47.76	43.88 ± 4.79
	2	35		52.24		47.76	
	3	36		53.73		46.27	
	4	40		59.7		40.3	
	5	42		62.69		37.31	
400 µg	1	27	32.8 ± 4.09	40.3	48.96 ± 6.1	59.7	51.04 ± 6.1
	2	32		47.76		52.24	
	3	35		52.24		47.76	
	4	32		47.76		52.24	
	5	38		56.72		43.28	

Lampiran 3.

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
PLAKUAN	25	3.0000	1.4434	1.00	5.00	2.0000	3.0000	4.0000
P_HMBTN	25	28.7760	19.2950	.00	59.70	14.9250	28.3600	47.0150

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		PLAKUAN	P_HMBTN
N		25	25
Normal Parameters a,b	Mean	3.0000	28.7760
	Std. Deviation	1.4434	19.2950
Most Extreme Differences	Absolute	.156	.134
	Positive	.156	.132
	Negative	-.156	-.134
Kolmogorov-Smirnov Z		.779	.669
Asymp. Sig. (2-tailed)		.579	.761

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol	5	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.00	.00
50 ng	5	19.1040	5.4211	2.4244	12.3728	25.8352	10.45	25.37
100 ng	5	29.8520	9.2613	4.1418	18.3525	41.3515	20.90	44.78
200 ng	5	43.8800	4.7907	2.1425	37.9316	49.8284	37.31	47.76
400 ng	5	51.0440	6.1002	2.7281	43.4696	58.6184	43.28	59.70
Total	25	28.7760	19.2950	3.8590	20.8114	36.7406	.00	59.70

Test of Homogeneity of Variances

P_HMBTN			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.300	4	20	.094

Lampiran 3 lanjutan

ANOVA

P_HMBTN

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8233.791	4	2058.448	58.704	.000
Within Groups	701.298	20	35.065		
Total	8935.088	24			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: P_HMBTN

Tukey HSD

(I) PLAKUAN	(J) PLAKUAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	50 ng	-19.1040*	3.7451	.000	-30.3109	-7.8971
	100 ng	-29.8520*	3.7451	.000	-41.0589	-18.6451
	200 ng	-43.8800*	3.7451	.000	-55.0869	-32.6731
	400 ng	-51.0440*	3.7451	.000	-62.2509	-39.8371
50 ng	kontrol	19.1040*	3.7451	.000	7.8971	30.3109
	100 ng	-10.7480	3.7451	.064	-21.9549	.4589
	200 ng	-24.7760*	3.7451	.000	-35.9829	-13.5691
	400 ng	-31.9400*	3.7451	.000	-43.1469	-20.7331
100 ng	kontrol	29.8520*	3.7451	.000	18.6451	41.0589
	50 ng	10.7480	3.7451	.064	-.4589	21.9549
	200 ng	-14.0280*	3.7451	.010	-25.2349	-2.8211
	400 ng	-21.1920*	3.7451	.000	-32.3989	-9.9851
200 ng	kontrol	43.8800*	3.7451	.000	32.6731	55.0869
	50 ng	24.7760*	3.7451	.000	13.5691	35.9829
	100 ng	14.0280*	3.7451	.010	2.8211	25.2349
	400 ng	-7.1640	3.7451	.343	-18.3709	4.0429
400 ng	kontrol	51.0440*	3.7451	.000	39.8371	62.2509
	50 ng	31.9400*	3.7451	.000	20.7331	43.1469
	100 ng	21.1920*	3.7451	.000	9.9851	32.3989
	200 ng	7.1640	3.7451	.343	-4.0429	18.3709

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 3 lanjutan

Homogeneous Subsets

P_HMBTN

Tukey HSD^a

PLAKUAN	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
kontrol	5	.0000		
50 ng	5		19.1040	
100 ng	5		29.8520	
200 ng	5			43.8800
400 ng	5			51.0440
Sig.		1.000	.064	.343

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

