

**Uji Aktivitas Ekstrak Daun *Gynura procumbens* Sebagai Antiangiogenesis pada Membran Korio Alantois Telur Ayam Berembrio yang Diinduksi basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)**

**Activity Test of *Gynura procumbens* Leaves Extract as Antiangiogenic on Chick Embryo Chorioallantoic Membrane Induced by basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)**

**Iwan S.H, R. Bijanti, R.S. Wahyuni, L. Maslachah, M. Gandul Atik. Y.**

Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya-60115.

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015

Email : kelana\_dawley@yahoo.com

**Abstract**

Angiogenesis supplies oxygen and nutrition for cancer cells in order to fulfill their needs to keep growing. So, a blockade of angiogenesis is a promising strategy to suppress tumor growth, invasion, and metastasis. Flavonoid which are concentrated in the extract of *Gynura procumbens* leaves are widely known has antiangiogenic effect. The chick CAM (Chorio Allantoic Membrane) methods was used for this aim. Eggs at the age of nine days were divided into 6 groups. Two groups are control: bFGF and vehicle. The next four groups are extract of *Gynura procumbens* leaves that variate in 4 dosage: 60, 75, 90 and 110 µg. At the age of twelve, macroscopic and microscopic analysis was done. Macroscopicly, the extract group can inhibit the new blood vessels formation. This fact is supported by microscopic analysis. Based on haematoxylin-eosin staining, angiogenic blood vessel in the extract group was less than the control bFGF group. The results showed that the extract of *Gynura procumbens* leaves could inhibit angiogenesis in a dose-dependent manner. Doses 60, 75, 90 and 110 µg gave angiogenesis response of  $242.50 \pm 69.63$ ;  $144.00 \pm 15.30$ ;  $92.75 \pm 5.38$  and  $70.25 \pm 13.07$ .

**Keywords :** *antiangiogenic, CAM, Gynura procumbens.*

---

**Pendahuluan**

Angiogenesis merupakan langkah penting dalam pertumbuhan dan metastasis tumor yang meliputi beberapa proses biologis. Pertama, pembuluh darah yang telah ada sebelumnya menjadi permeabel dan melebar. Selanjutnya, matriks ekstraselular terdegradasi diikuti oleh proliferasi dan migrasi sel endotel ke arah datangnya stimulus. Terakhir, menarik beberapa sel suport seperti *pericytes cell* dan pembentukan lumen pembuluh darah baru. Pengiriman oksigen dan nutrisi, eliminasi sisa metabolisme dan karbondioksida tergantung pada sistem vaskularisasi, dengan demikian pembentukan jaringan baru termasuk pembentukan sel-sel kanker secara sistematis dikoordinasikan dengan pembentukan pembuluh darah baru atau angiogenesis (Tannock *et al.*, 2005).

Angiogenesis memiliki peranan penting dalam perkembangan tumor dari kecil menjadi

neoplasma lokal kemudian tumbuh lebih besar dan berpotensi sebagai kanker yang bermetastasis. Tumor yang tumbuh melampaui 1mm<sup>3</sup> sampai 2mm<sup>3</sup> membutuhkan suplai darah yang independen, diperoleh dengan mengekspresikan faktor pertumbuhan (pro-angiogenik) yang meng-induksi pembentukan pembuluh darah baru. *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) merupakan salah satu faktor proangiogenik utama yang berperan dalam angiogenesis (Ribatti, 2000). Proses ini terus berlanjut bahkan sebagai tumor dewasa, dengan demikian *upregulation* dari angiogenesis merupakan langkah penting dalam pertumbuhan dan metastasis tumor sehingga pengembangan agen inhibitor angiogenesis tampak menjanjikan dalam usaha penyembuhan kanker (Tannock *et al.*, 2005).

Mekanisme pembentukan kanker yang sangat kompleks menjadikan penelitian penemuan obat kanker menjadi sesuatu yang sangat penting.

Berdasarkan hasil penelitian ilmiah yang pernah dilakukan mengenai khasiat daun *Gynura procumbens* sebagai obat kanker, perlu dilakukan penelitian apakah ekstrak etanol daun *Gynura procumbens* mempunyai efek antikarsinogenesis melalui hambatan angiogenesis (antiangiogenesis).

### Materi dan Metode Penelitian

#### Bahan

Ekstrak daun *Gynura procumbens* yang dilarutkan dengan *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) ketika akan diujikan. Induktor angiogenesis yang digunakan adalah *recombinant human* bFGF 10ng/ $\mu$ l (Nako-Japan No.kat 067.0431). Telur ayam berembrio (TAB) *Specific Pathogenic Free* berumur 9 hari (dalam kondisi terinkubasi), dibeli di Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma), Surabaya. Bahan kimia yang lain adalah pelarut bFGF, Tris-HCl 0,01 M pH 7,5; pengawet membran CAM, buffer fosfat formalin 10%; aqua steril (Plabottle, Otsuka- Indonesia).

#### Pembuatan Ekstrak Daun *Gynura procumbens*

Sebanyak 500 gram serbuk daun *Gynura procumbens* diekstrak dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 1,5 L. Pengadukan dilakukan dua kali yaitu pada pagi dan sore hari, setelah 3 x 24 jam dilakukan penyaringan. Ampas dimaserasi kembali dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1,5 L. Maserasi dilakukan tiga kali. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan kemudian diendapkan, lalu disaring untuk selanjutnya diuapkan dengan pengurangan tekanan hingga diperoleh ekstrak kental.

#### Uji Daya Hambat Angiogenesis

Uji daya hambat terhadap angiogenesis dilakukan pada CAM TAB berumur sembilan hari. Kerabang TAB dipotong dengan gergaji (*mini drill*) hingga membentuk lubang segiempat dengan luas 1 cm<sup>2</sup>. Melalui lubang ini larutan uji diimplantasi ke dalam membran korioalantois menggunakan media *paper disc*. Subyek uji berupa TAB dibagi dalam enam perlakuan, tiap perlakuan terdiri dari empat TAB. Perlakuan I : Kontrol positif, pemberian bFGF sebanyak 60 ng. Perlakuan II : Kontrol negatif, pemberian pelarut (Tris-HCl dan DMSO 2%). Perlakuan III : Kelompok uji I, pemberian bFGF sebanyak 60 ng dan ekstrak etanol *Gynura procumbens* sebanyak 60  $\mu$ g. Perlakuan IV : Kelompok uji II, pemberian bFGF sebanyak 60 ng dan ekstrak etanol *Gynura*

*procumbens* sebanyak 75  $\mu$ g. Perlakuan V : Kelompok uji III, pemberian bFGF sebanyak 60 ng dan ekstrak etanol *Gynura procumbens* sebanyak 90  $\mu$ g. Perlakuan VI : Kelompok uji IV, pemberian bFGF sebanyak 60 ng dan ekstrak etanol *Gynura procumbens* sebanyak 110  $\mu$ g.

Setelah diberi perlakuan, telur diinkubasi pada suhu 38 sampai 39°C dan kelembaban relatif 60% selama tiga hari atau 72 jam (Ribatti dkk, 1997), dilanjutkan dengan mematikan TAB kedalam *freezer* selama 24 jam. Setelah itu telur dibuka, isi telur dikeluarkan perlahan agar membran korioalantois tetap melekat pada cangkang telur. Pembuluh darah baru di sekitar dan pada *paper disc* dihitung. Kemudian membran korioalantois disekitar *paper disc*, dikoleksi pada buffer formalin 10%, selanjutnya dilakukan pembuatan sediaan histologi dengan pewarnaan HE.

#### Analisis Data

Evaluasi uji antiangiogenik secara makroskopik dilakukan dengan menghitung jumlah pembuluh darah baru pada *paper disc* maupun di sekeliling *paper disc* tersebut (berpola radial). Pengamatan secara Mikroskopis dilakukan dengan menghitung jumlah pembuluh darah baru pada sediaan histopatologi pewarnaan HE dengan memilih 6 lapangan pandang berbeda secara acak, kemudian pembuluh darah baru dari enam lapangan pandang tersebut dijumlahkan (Ribatti *et al.*, 2000). Data yang diperoleh baik makroskopis maupun mikroskopis dianalisis dengan Analisis Varian (Anava) uji *Fisher* (F) satu arah taraf kepercayaan 95% dan bila terjadi perbedaan signifikan ( $p < 0.05$ ) dilanjutkan uji Jarak Berganda *Duncan*. Perbandingan statistik dilakukan dengan menggunakan *SPSS 13.0 for windows*.

### Hasil dan Pembahasan

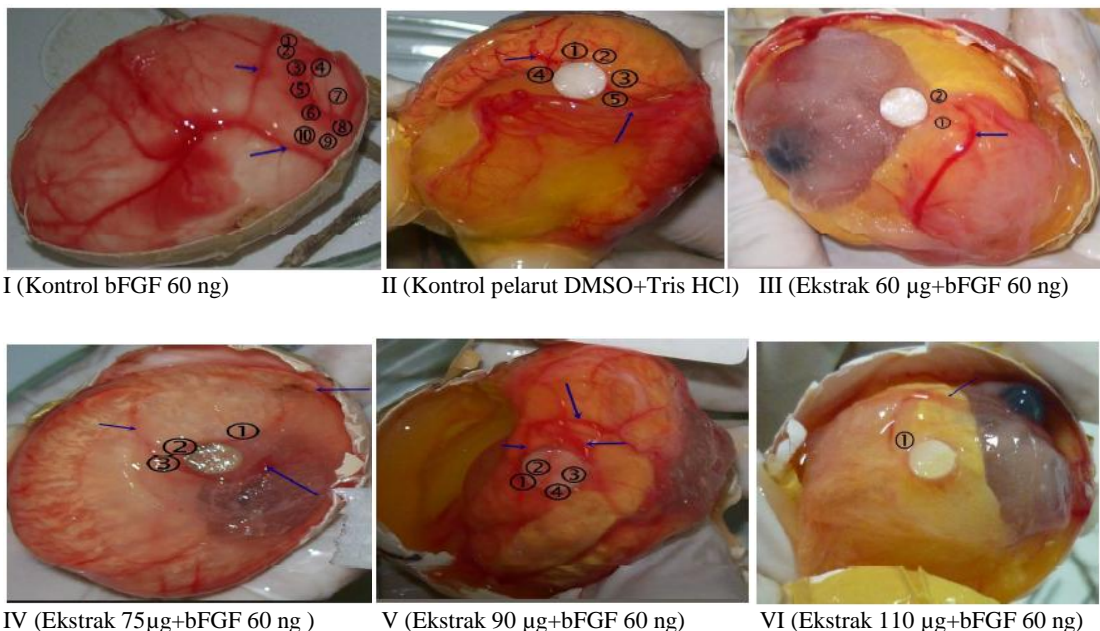
Hasil penghitungan rerata respon angiogenesis atau pembuluh darah baru pada membran korioalantois telur ayam berembrio pada setiap perlakuan secara makroskopis dan mikroskopis tersaji pada Tabel 1.

Berikut ini adalah gambar pengamatan aktivitas ekstrak daun *Gynura procumbens* sebagai antiangiogenesis pada membran korioalantois TAB secara makroskopis (Gambar 1) dan mikroskopis (Gambar 2).

**Tabel 1.** Rerata jumlah pembuluh darah baru secara makroskopis dan mikroskopis pada membran korioalantois TAB setiap kelompok perlakuan

Kelompok perlakuan	Jumlah pembuluh darah baru (rerata $\pm$ SD)	
	Makroskopis	Mikroskopis
I. Kontrol positif	21,50 <sup>c</sup> $\pm$ 6,56	502,00 <sup>d</sup> $\pm$ 70,59
II. Kontrol negatif	4,00 <sup>a</sup> $\pm$ 1,63	105,25 <sup>ab</sup> $\pm$ 7,37
III. Kelompok uji I	7,75 <sup>ab</sup> $\pm$ 3,86	242,50 <sup>c</sup> $\pm$ 69,63
IV. Kelompok uji II	11,25 <sup>b</sup> $\pm$ 0,96	144,00 <sup>b</sup> $\pm$ 15,30
V. Kelompok uji III	5,75 <sup>a</sup> $\pm$ 1,71	92,75 <sup>ab</sup> $\pm$ 5,38
VI. Kelompok uji IV	3,75 <sup>a</sup> $\pm$ 2,63	70,25 <sup>a</sup> $\pm$ 13,07

Keterangan : superskrip (<sup>a</sup>, <sup>ab</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup>) yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (signifikan) antara tiap perlakuan ( $p < 0,05$ )



**Gambar 1.** Pengamatan makroskopis aktivitas ekstrak daun *Gynura procumbens* pada CAM TAB. Tanda (→) menunjukkan percabangan pembuluh darah asal dan tanda (O) menunjukkan pembuluh darah baru yang terbentuk pada dan sekitar *paper disc* berpola radial

Pada penelitian ini, kelompok kontrol negatif (tris-HCL+DMSO) memberikan respon angiogenesis yang rendah, sedangkan pada kelompok kontrol positif (bFGF 60ng) memberikan respon angiogenesis yang sangat berbeda nyata ( $p < 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa 60 ng bFGF cukup efektif dalam menginduksi angiogenesis. Secara keseluruhan, respon angiogenesis yang diberikan oleh tiap kelompok uji ekstrak daun *Gynura procumbens* memberikan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kelompok kontrol positif. Kelompok uji ekstrak daun *Gynura*

*procumbens* tersebut mampu memberikan hambatan angiogenesis yang cukup besar.

Hasil rerata jumlah pembuluh darah baru terendah pada pengamatan makroskopis ditunjukkan oleh kelompok uji IV sebesar 3,75 $\pm$ 2,63. Hasil tersebut tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) dengan kelompok uji III (5,75  $\pm$  1,71), kelompok uji I (7,75  $\pm$  3,86) dan kelompok kontrol negatif (4,00  $\pm$  1,63). Pengamatan mikroskopis pembuluh darah baru pada membran korioalantois telur ayam berembrio juga perlu dilakukan untuk konfirmasi hasil penghitungan secara makroskopis. Hasil rerata jumlah pembuluh darah baru terendah pada

pengamatan mikroskopis ditunjukkan oleh kelompok uji IV sebesar 70,25+13,07. Hasil tersebut tidak berbeda nyata ( $p>0,05$ ) dengan kelompok uji III (92,75 + 5,38) dan kelompok kontrol negatif (105,25 + 7,37). Kelompok uji II juga memberikan respon angiogenesis yang tidak berbeda nyata ( $p>0,05$ ) dengan kelompok kontrol negatif (144,00 + 15,30). Hasil ini menunjukkan bahwa terdapat hambatan pertumbuhan pembuluh darah baru pada pemberian ekstrak daun *Gynura procumbens* dosis 75 µg, 90 µg dan 110 µg sebanding dengan angiogenesis normal pada CAM TAB. Pengamatan mikroskopis respon angiogenesis kelompok uji *Gynura procumbens* memberikan persentasi (%) penghambatan yang semakin meningkat sebanding dengan besarnya dosis ekstrak daun *Gynura procumbens* yang dicobakan. Penghambatan respon angiogenesis atau antiangiogenesis yang diberikan oleh tiap dosis ekstrak daun *Gynura procumbens* mulai dari 60 µg, 75 µg, 90 µg dan 110 µg masing-masing secara berurutan adalah 51,59 %, 71,32%, 81,52% dan 86,01%.

Berbagai zat kimia yang mungkin terkandung dalam ekstrak daun *Gynura procumbens* diduga berperan dalam menghambat angiogenesis pada CAM. Zat kimia atau substansi antiangiogenesis yang dimiliki oleh *Gynura procumbens* mungkin bekerja melalui beberapa mekanisme yaitu melalui penghambatan stimulator angiogenik, reseptor angiogenik, matriks ekstraseluler, dan penghambatan melalui proteolisis, pengaturan atau pengendalian angiogenesis oleh sinyal hipoksia, dan target penghambatan pada pembuluh darah secara langsung (Ribatti *et al.*, 2000).

Efek ekstrak etanolik daun *Gynura procumbens* sebagai antiproliferasi dan menginduksi apoptosis (Meiyanto dan Septisetyani, 2005) kemungkinan berkaitan dengan mekanisme penghambatan angiogenesis secara langsung pada sel endotelial yaitu menghambat terjadinya migrasi dan proliferasi sehingga pembuluh darah baru tidak terbentuk. Pada proses ini, bila ada sel endotelial yang tetap lepas bermigrasi kemungkinan bisa dihambat melalui mekanisme apoptosis sehingga sel endotelial tersebut tidak bisa berproliferasi membentuk pembuluh darah baru.

Sebagaimana diketahui ekstrak daun *Gynura procumbens* memiliki kandungan diantaranya flavonoid, yang kemungkinan dapat meng-

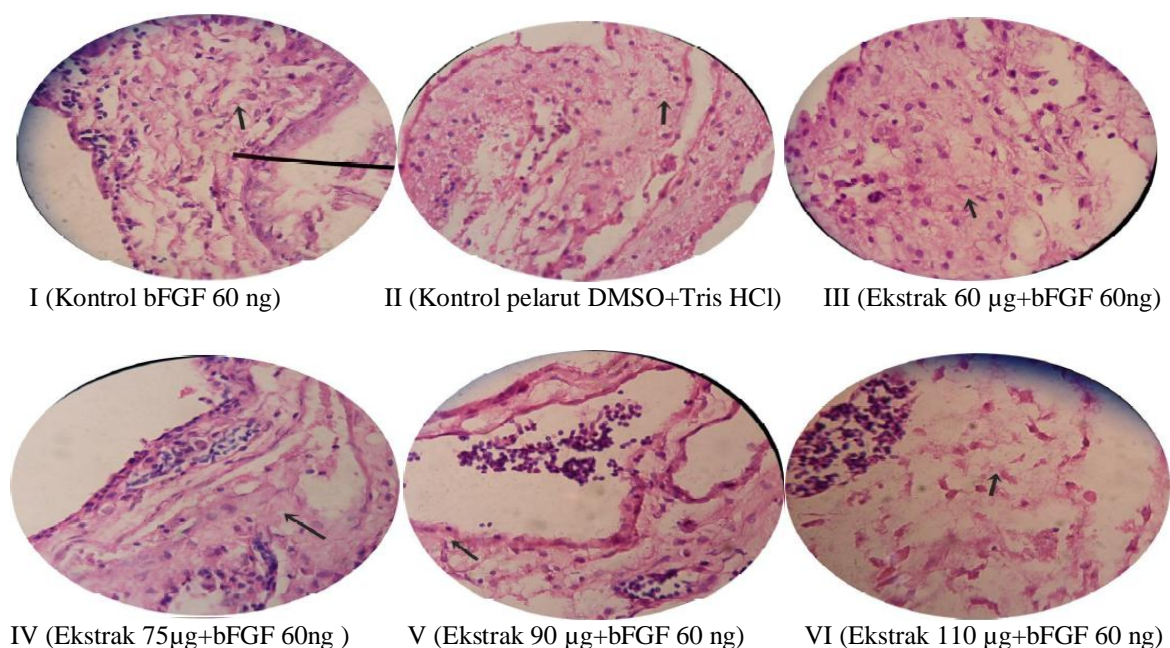
hambat proses angiogenesis yang telah ditunjukkan pada percobaan ini. Flavonoid utama yang terdapat dalam ekstrak etanol daun *Gynura procumbens* adalah *quercetin* dan *resveratrol* (Sugiyanto dkk., 2003). Flavonoid tersebut menghambat proses transduksi sinyal dari faktor pertumbuhan dan mampu menginaktivasi protein-protein yang berperan dalam transduksi sinyal melalui *cell cycle arrest*, sehingga menginduksi terjadinya apoptosis (Meiyanto dan Septisetyani, 2005).

*Quercetin* memiliki aktivitas sebagai antiangiogenik melalui penghambatan tyrosine kinase dan mengurangi aktivitas serta ekspresi MMP-2 (Tan *et al.*, 2003.). MMP-2 terlibat dalam sejumlah langkah angiogenik (migrasi, invasi, dan pembentukan lumen pembuluh darah) pada CAM. Dosis 50-100 nmol/10 µl / telur merupakan dosis efektif dalam memunculkan suatu respon antiangiogenik (Tan *et al.*, 2003.). *Quercetin* mampu menghambat proliferasi sel endotel dan pembentukan lumen pembuluh darah pada konsentrasi 10 sampai 100 µM dan dapat menginduksi apoptosis pada konsentrasi 100 µM (Chen *et al.*, 2008).

*Resveratrol* langsung menghambat pertumbuhan sel endotel dan menurunkan aktivitas MMP-2. *Resveratrol* juga menekan aksi COX-1 (Igura *et al.*, 2001.). COX-1 diproduksi oleh sel endotel dan memainkan peran penting dalam mengatur angiogenesis. Studi lain oleh Mousa, dkk. (2005) menunjukkan bahwa *resveratrol* menghambat angiogenesis yang diinduksi oleh bFGF pada CAM dan juga menghambat pertumbuhan tumor pada CAM.

Selain *resveratrol* dan *quercetin*, juga di temukan *kaempferol*. Hal ini diperkuat oleh penelitian yang dilakukan oleh Liu, dkk. (2010) yang menemukan bahwa kandungan flavonoid tertinggi pada tanaman ini selain *quercetin* adalah *kaempferol*. Pada membran korioalantois TAB, *kaempferol* secara signifikan menghambat angiogenesis yang diinduksi faktor pertumbuhan tumor (Luo *et al.*, 2009).

Berdasarkan fakta dari uraian ini maka sangat mungkin ekstrak daun *Gynura procumbens* memiliki aktivitas sebagai antiangiogenesis dengan mekanisme penghambatan angiogenesis seperti yang telah di jelaskan. Pada penelitian ini ekstrak daun *Gynura procumbens* telah mampu menghambat angiogenesis pada dosis 60 µg.



Gambar 2. Pengamatan mikroskopis aktivitas ekstrak daun *Gynura procumbens* sebagai antiangiogenesis pada preparat histopatologi pewarnaan HE(pembesaran 1000x). Tanda (→) menunjukan pembuluh darah baru yang terbentuk pada CAM TAB di sekitar *paper disc*.

### Kesimpulan

Pemberian ekstrak daun *Gynura procumbens* mampu menghambat jumlah pembentukan pembuluh darah baru secara makroskopis dan mikroskopis pada membran korioalantois TAB yang diinduksi bFGF. Aktivitas antiangiogenesis ekstrak daun *Gynura procumbens* terbesar ditunjukkan oleh dosis 90 dan 110 µm.

### Daftar pustaka

- Chen, Y., X.X. Li, N.Z. Xing, and X.G. Cao. 2008. Quercetin inhibits choroidal and retinal angiogenesis in vitro. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008 Mar;246(3):373-8.
- Igura, K., T. Ohta, Y. Kuroda, and K. Kaji. 2001. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro, *Cancer Lett*, 171 (1): 11-6.
- Liu, W., Y. Yu, R. Yang, C. Wan, B. Xu and S. Cao. 2010. Optimization of Total Flavonoid Compound Extraction from *Gynura medica* Leaf Using Response Surface Methodology and Chemical Composition Analysis. *Int. J. Mol. Sci*. 2010, 11, 4750-4763; doi:10.3390/ijms11114750.
- Luo, H., G.O. Rankin, L. Liu, M.K. Daddysman, B.H. Jiang, and Y.C. Chen. 2009. Kaempferol Inhibits Angiogenesis and VEGF Expression Through Both HIF Dependent and Independent Pathways in Human Ovarian Cancer Cells. *Nutr Cancer*. 2009 ; 61(4): 554-563. doi:10. 1080/01635580802666281.
- Meiyanto, E. dan E.P. Septisetyani. 2005. Efek Antiproliferatif dan Apoptosis Fraksi Fenolik Daun *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. terhadap Sel HeLa, *Artocarpus*, 5(2).
- Mousa. S.S., S.S. Mousa, S.A. Mousa. 2005. Effect of resveratrol on angiogenesis and-platelet/fibrin-accelerated tumor growth in the chick chorioallantoic membrane model. *Nutr Cancer*. 2005;52(1):59-65.
- Ribatti, D., A. Gulantris, M. Bastaki, A. Vacca, M. Iurlaro, L. Roncali and M. Presta. 1997. New Model for the Study of Angiogenesis and Antiangiogenesis in the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane : The Gelatin Sponge / Chorioallantoic Membrane Assay, *of Vascular Research*, 34:455-463.
- Ribbati, D., A. Vacca, L. Roncalli, F. Dammacco. 2000. The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a model for in vivo

- Research on Anti-Angiogenesis. J. Current Pharmaceut Biotech. 1: 73-82
- Sugiyanto, B. Sudarto, E. Meiyanto, A.E. Nugroho, A. Umar dan Jenie. 2003. Aktivitas Antikarsinogenik Senyawa Yang Berasal Dari Tumbuhan. *Majalah Farmasi Indonesia*. 14(4), 216-225.
- Tan, W.F., L.P. Lin, M.H. Li, Y.X. Zhang, Y.G. Tong, D. Xiao, J. Ding. 2003. Quercetin, a dietary derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential.. *Eur J. Pharmacol.* 2003;459:255-62
- Tannock IF., RP. Hill, RG. Bristow. 2005. *Basic Science of Oncology*. 4th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 231-248.