

Hambatan Ekspresi Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) oleh Ekstrak Daun *Gynura procumbens* pada Pembuluh Darah Membran Korioalantois Telur Ayam Berembrio**Effectivity of *Gynura procumbens* Extract to Inhibit Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression on New Blood Vessels of Chorioallantois Membran (CAM) Chick Embryonal****¹Iwan Sahrial Hamid, ²Rosanti Kurnia Dewi, ¹Dady Soegianto Nazar, ¹Hermin Ratnani**¹Fakultas Kedokteran Hewan Unair²PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampuc C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya – 60115

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993014

Email : vetunair@telkom.net

Abstract

Angiogenesis is the new blood vessels formation normality and important on growth and development of individu. Angiogenesis also have contribution to carcinogenesis or uncontrolled and malignant cancer cell development, become pathologic condition like inflammatory and infection. The purpose of this research for knew the effectivities of *Gynura procumbens* extract on various dose for inhibition VEGF expression. This research was done to effort cancer progress inhibition. However, angiogenesis is part of carcinogenesis causes. The Chorio Allantoic Membrane (CAM) methods was used for this aim. Eggs at the age of nine days were divided into 6 groups. Group I were negative control of vehicle, group II were zero treatment: 60 ng bFGF which aplicated into paper dish. The next four groups were extract of *Gynura procumbens* that divided in four dose: 60, 75, 90 and 110 µg + bFGF 60 ng which applicated into paper dish. At the twelve days old, VEGF expression analysis was done which imunohistochemical method with anti VEGF's antibody. The result of this research showed that there was significant different ($p < 0.05$) on give of *Gynura procumbens* extract to VEGF expression. The most significant VEGF inhibition by *Gynura procumbens* extract with dose 110 µg. The conclusion on this study was *Gynura procumbens* extract effective to inhibit the VEGF expression on CAM embrio chick.

Keywords : Angiogenesis, VEGF, *Gynura procumbens*, CAM**Pendahuluan**

Beberapa upaya untuk mengatasi semakin meningkatnya kejadian kanker masih banyak menemui kendala, baik dalam upaya pencegahan maupun pengobatan kanker. Pengobatan yang selama ini dilakukan meliputi penyinaran, radioterapi, pembedahan, dan kemoterapi menggunakan obat (Novalina, 2003). Pengobatan kanker dengan cara membunuh sel kanker dianggap masih kurang efektif karena karsinogen yang terdapat dalam sel kanker masih dapat menyebar ke jaringan lain bersama aliran darah. Oleh karena itu, pengobatan kanker melalui penghambatan angiogenesis lebih efektif dalam mengobati kanker dari pada membunuh sel kanker secara langsung. Selain itu penghambatan

angiogenesis mengakibatkan hambatan pada distribusi nutrisi dan oksigen ke sel kanker sehingga pertumbuhan sel kanker lebih lanjut juga terhambat (Raffi, 2002).

Proses angiogenesis sebagai indikator adanya perubahan status sel kanker dari benigna menjadi maligna. Sel kanker diketahui bersifat maligna apabila sudah berukuran lebih dari 2 mm³ (Bergers, *et al.*, 2002). Perkembangan sel kanker terutama yang bersifat maligna menginduksi terbentuknya angiogenesis dengan mengaktifasi beberapa faktor pertumbuhan seperti Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Epidermal Growth Factor (EGF)

dan *Tumour Necrosis Factor* (TNF α) (Papetti dan Herman, 2002).

Vascular Endothelial Growth Factor diketahui mempunyai kontribusi besar terhadap angiogenesis. Percobaan *in vitro* sel endotel kapiler menunjukkan bahwa VEGF merupakan stimulator yang potensial terhadap angiogenesis sebab keberadaannya sebagai faktor pertumbuhan mengakibatkan proliferasi dan migrasi sel endotel, bahkan pembentukan *tube formation* pada perangkaian pembuluh kapiler (Prior, *et al.*, 2004). *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) memicu transformasi embrional mesoderm menjadi hemangioblast. Terbentuknya hemangioblast mengaktifasi VEGF membentuk angioblast, selanjutnya angioblast berdeferensiasi menjadi sel endotel yang bermigrasi ke arah tepi lumen pembuluh darah (Papetti dan Herman, 2002).

Penggunaan obat asal tanaman menjadi alternatif dalam upaya pencegahan kanker melalui hambatan angiogenesis. Dipilih satu tanaman obat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ekstrak daun sambung nyawa (*Gynura procumbens*), dimana berdasarkan penelitian sebelumnya telah dicoba khasiatnya baik *in vitro* maupun *in vivo* pada beberapa kejadian kanker, seperti kanker kelenjar mammae, kanker paru, kanker servik dan kolon (Meiyanto, dkk., 2007). Angiogenesis tidak terlepas dari peran besar faktor pertumbuhan, maka sebagai fokus utama dalam penelitian ini akan diamati ekspresi VEGF sebagai faktor pertumbuhan angiogenesis. Pengamatan dilakukan dengan pemberian ekstrak daun *Gynura procumbens* dalam berbagai dosis pada endotel dari pembuluh darah membran korioalantois telur ayam berembrio yang diinduksi dengan bFGF.

Materi dan Metode Penelitian

Bahan

Penelitian ini menggunakan TAB *Specific Pathogen Free* (SPF) dari pusvetma, berumur sembilan hari sebagai bahan untuk uji antiangiogenesis. Telur Ayam Berembrio yang dipakai berasal dari induk ayam jenis *Hubbard* produksi PT. Wonokoyo. Tanaman yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun sambung nyawa (*Gynura procumbens*) dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Surakarta. Daun dari tanaman tersebut diambil secara acak dengan kondisi yang masih segar lalu diproses hingga mendapatkan ekstrak

etanolnya. Ekstrak etanol *Gynura procumbens* menggunakan dosis 60, 75, 90 dan 110 μ g. Induktor angiogenesis yang digunakan adalah *recombinant human* bFGF dari *Nako Pure Chemical Industries Ltd. Japan* yang didapar dengan Tris-HCl pH 7,5.

Pembuatan Ekstrak Etanolik Daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens*)

Daun *Gynura procumbens* dicuci bersih dengan air mengalir, ditiriskan, dijemur dengan panas matahari tidak langsung dengan ditutupi kain warna gelap. Setelah kering, diserbuk dan diayak hingga diperoleh serbuk daun *Gynura procumbens*. Sebanyak 500 gram serbuk 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 menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental.

Perlakuan Pada TAB

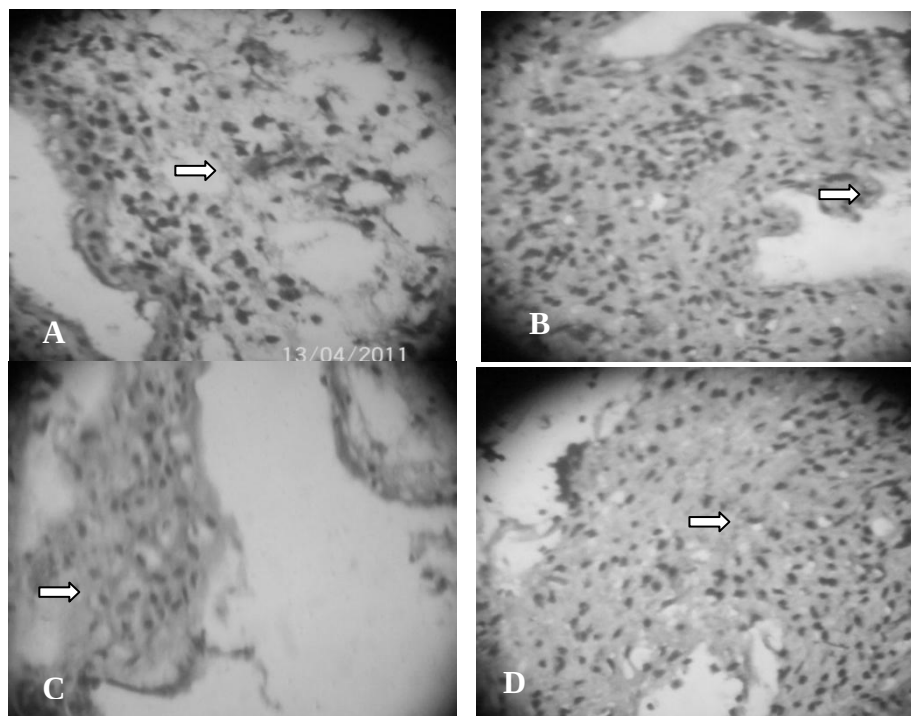
Telur ayam berembrio umur sembilan hari diberi tanda pada kerabang telur yang meliputi batas ruang udara, lokasi embrio dan daerah yang akan dibuat lubang segiempat (jendela) berukuran 1 cm² di atas embrio. bFGF dan ekstrak diimplankan melalui *paper disc*. Subyek uji yang berupa telur di bagi dalam enam kelompok dan setiap kelompok ada empat replikasi : Kelompok I, pelarut Tris-HCl dan DMSO 2%, Kelompok II, bFGF 60 ng dan pelarut Tris-HCl dan DMSO 2%, Kelompok III, IV, V dan VI ekstrak etanol *Gynura procumbens* sebanyak 60, 75, 90 dan 110 μ g dalam DMSO 2%. Setelah diberi perlakuan, kemudian telur diinkubasi pada suhu 38⁰ C dan kelembaban relatif 60 % selama tiga hari atau 72 jam (Ribatti dkk, 1997). membran korioalantois yang terdapat pembuluh darah dikoleksi pada buffer formalin. Selanjutnya dilakukan pembuatan sediaan imunohistokimia. Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis ekspresi VEGF dengan Analisis Varian (Anava) uji *Fisher* (F) satu arah taraf kepercayaan 95% dan bila terjadi perbedaan signifikan dilanjutkan uji

perbandingan rerata setiap kelompok perlakuan dengan uji Jarak Berganda *Duncan*.

Hasil Dan Pembahasan

Hasil gambar pengamatan ekspresi VEGF pada kelompok perlakuan nol tampak pada sel endotel yang tersebar pada potongan pembuluh darah baru didominasi oleh adanya warna coklat. Hal tersebut sangat kontras bila dibandingkan dengan kelompok kontrol

negatif yang hanya diberi pelarut, lebih didominasi warna biru pada sitoplasma sel endotel. Hasil gambar ekspresi VEGF pada pemberian ekstrak *Gynura procumbens* semakin berkurang warna coklat pada sitoplasma seiring dengan peningkatan dosis ekstrak dari 60 µg sampai dengan 110 µg. Hasil pengamatan mikroskopis ekspresi VEGF pada setiap kelompok perlakuan tampak pada Gambar 1.



Gambar 1. Ekspresi VEGF pada sel endotel pembuluh darah membran korioalantois TAB, A) kelompok perlakuan nol bFGF 60 ng dengan pembesaran 400x, B) kelompok kontrol negatif pelarut dengan pembesaran 400x, C) kelompok perlakuan ekstrak 75 µg dengan pembesaran 400x, D) kelompok perlakuan ekstrak 110 µg dengan pembesaran 400x. Tanda panah menunjukkan ekspresi VEGF.

Hasil pengamatan mikroskopis ekspresi VEGF dilanjutkan dengan melakukan penghitungan terhadap sel endotel yang tampak berwarna coklat. Penghitungan dilakukan terhadap tiga lapang pandang selanjutnya dijumlahkan minimal pada 100 sel. Data penghitungan yang diperoleh dari semua kelompok perlakuan dilakukan analisis statistik dengan menggunakan bantuan perangkat lunak SPSS 13.0 *version for windows*. Analisis data diawali dengan uji normalitas *One-sample Kolmogorov-Smirnov*, setelah semua data dari setiap kelompok perlakuan dimasukkan pada program, maka

didapatkan hasil probabilitas atau $p = 0.896$, ini berarti data berdistribusi normal karena lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$). Setelah didapat hasil uji normalitas data, maka selanjutnya untuk mengetahui perbedaan rerata jumlah ekspresi VEGF dengan pemberian ekstrak *Gynura procumbens* berbagai dosis dilakukan analisis varian uji F. Hasil yang diperoleh adalah signifikan ($p < 0.05$). Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nyata pada pemberian ekstrak *Gynura procumbens* dengan berbagai dosis terhadap jumlah VEGF yang diekspresikan pada sel endotel pembuluh darah baru korioalantois TAB.

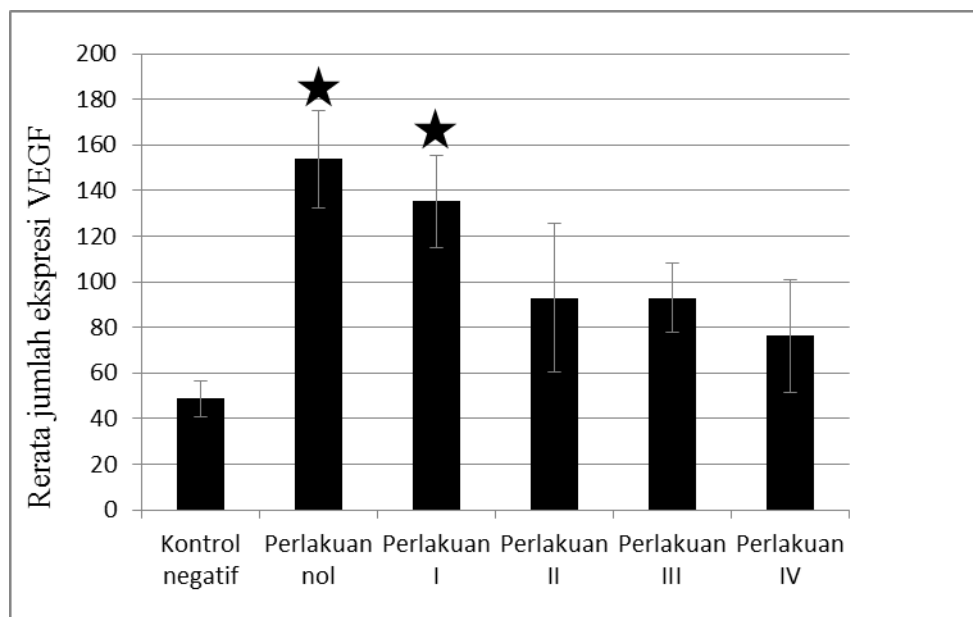
Adanya perbedaan signifikan pada uji F, maka perlu dilakukan uji lanjutan. Perbedaan rerata ekspresi VEGF antar perlakuan dapat dijelaskan melalui uji lanjutan

menggunakan uji jarak berganda *Duncan*. Rerata ekspresi VEGF dan persentase hambatan VEGF pada setiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Rerata jumlah ekspresi VEGF pada setiap kelompok perlakuan

No	Kelompok Perlakuan	Rerata
I	Kontrol negatif (Tris HCl dan DMSO)	48,75 ^c ± 7,89
II	Perlakuan Nol (bFGF 60 ng + Tris HCl dan DMSO)	153,75 ^a ± 21,40
III	Perlakuan I (Ekstrak <i>G.procumbens</i> 60 µg+ bFGF 60 ng)	135,25 ^a ± 20,22
IV	Perlakuan II (Ekstrak <i>G.procumbens</i> 75 µg+ bFGF 60 ng)	93,00 ^b ± 32,61
V	Perlakuan III (Ekstrak <i>G.procumbens</i> 90 µg+ bFGF 60 ng)	93,00 ^b ± 15,08
VI	Perlakuan IV (Ekstrak <i>G.procumbens</i> 110 µg+ bFGF 60 ng)	76,25 ^{bc} ± 24,78

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)



Gambar 2. Grafik rerata jumlah ekspresi VEGF dan standart deviasi. Keterangan: tanda bintang menunjukkan berbeda nyata.

Hasil penghitungan rerata ekspresi VEGF tertinggi didapatkan pada perlakuan nol pemberian bFGF 60 ng tanpa ekstrak (II) yaitu sebesar 153,75 ± 21,40 dan rerata tersebut tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) dengan perlakuan ekstrak 60 µg (III), yaitu 135,25 ± 20,22. Ekspresi VEGF yang rendah

didapatkan pada kelompok kontrol pelarut (I) yaitu 48,75 ± 7,89 dan kelompok ekstrak 110 µg (VI) yaitu 76,25 ± 24,78, kedua kelompok perlakuan tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$). Kelompok perlakuan I dan VI memberikan hasil yang terbaik terhadap hambatan ekspresi

VEGF, hasil tersebut berbeda nyata ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan II dan III. Perlakuan ekstrak 75 μg (IV) dan 90 μg (V) memberikan hasil rerata yang relatif sama yaitu $93,00 \pm 32,61$ dan $93,00 \pm 15,08$. Kelompok perlakuan IV dan V juga memberikan hasil rerata ekspresi VEGF yang berbeda nyata ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan bFGF (II) dan III.

Ekspresi VEGF ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada sitoplasma sel yang merupakan kompleks ikatan ligan VEGF dengan reseptor VEGF terdeteksi oleh antibodi anti VEGF yang terikat spesifik dengan ligan VEGF. Konsep ekspresi VEGF tersebut tampaknya sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Puspita dkk. (2009) bahwa terjadi ekspresi VEGF pada sitoplasma sel yang diberi induktor bFGF. Menurut Giovana *et al* (2009), menyatakan bahwa ikatan reseptor VEGF dan ligan spesifik VEGF terjadi pada domain transmembran dan sitoplasmik, bahkan dikatakan pula bahwa VEGF diketahui sebagai promotor angiogenesis dan merupakan regulator endogen untuk integritas endotel, beberapa senyawa anti VEGF dapat menyebabkan disfungsi endotel dan penurunan angiogenesis.

Ekstrak *Gynura procumbens* tampaknya berperan penting dalam hambatan angiogenesis melalui penurunan ekspresi VEGF. Kandungan flavonoid mempunyai peran dalam menghambat beberapa faktor pertumbuhan angiogenesis maupun tumor. Pernyataan tersebut sesuai dengan hasil penelitian Wen-fu Tan (2002) yang menyatakan bahwa *quercetin* yang terkandung dalam *flavonoid* ekstrak daun *Gynura procumbens* menekan pertumbuhan tumor *in vitro* dan *in vivo* melalui hambatan aktivitas tirosin kinase, sedangkan pertumbuhan tumor merupakan salah satu pemicu aktivitas faktor pertumbuhan angiogenesis, salah satunya VEGF, untuk memulai proses pembentukan pembuluh darah baru (Kristy dan Ferrara, 2002).

Kandungan beberapa senyawa aktif dalam ekstrak daun *Gynura procumbens* seperti β sitosterol, 4-hidroksi-4 metil-2-pentanon, *quercetin* dan *resveratrol* diduga mempunyai aktivitas sebagai antikanker melalui beberapa kemungkinan mekanisme, yaitu sebagai penghambat proses sinyal transduksi, memacu *cell cycle arrest*, apoptosis

dan bahkan menghambat metastasis. Terdapat dugaan bahwa kandungan senyawa yang ada dalam ekstrak *Gynura procumbens* mungkin bertindak sebagai inhibitor aktivitas COX-2 yang dipicu oleh angiogenik bFGF. Mekanisme hambatan angiogenesis melalui hambatan ekspresi VEGF, berdasarkan beberapa penelitian yang dilakukan oleh peneliti lain dapat dijelaskan bahwa kandungan flavonoid ekstrak *Gynura procumbens* kemungkinan menghambat reseptor VEGF (VEGFR2) melalui hambatan aktivitas MMP, tirosin kinase dan COX-2.

Kesimpulan

Ekstrak *Gynura procumbens* dalam berbagai dosis dapat menghambat ekspresi VEGF pada sel endotel pembuluh darah membran korioalantois Telur Ayam Berembrio (TAB) yang diinduksi bFGF dengan menggunakan metode imunohistokimia. Ekspresi VEGF terendah dan hambatan ekspresi VEGF tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak *Gynura procumbens* 110 μg .

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada proyek Hibah Penelitian RKAT DIP A Fakultas Kedokteran Hewan Unair dan semua Pembimbing.

Daftar Pustaka

- Bergers, G., and D, Hanahan .2008. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 8: 592–603
- Giovana, S. Di Marco., R, Stefan., H, Uta., A, Susanne., Maximilian., König., L, Etienne., O, Hans., B, Eva., P, Hermann., and Marcus, B. 2009. The Soluble VEGF Receptor sFlt1 Contributes to Endothelial Dysfunction in CKD. *Journal of the American society of Nephrology*. vol. 20 no. 10 2235-2245
- Kristy, R., and Napoleone, F. 2006. Imaging tumor angiogenesis. *J Clin Invest*. Vol. 116 (10): 2585–2587.
- Meiyanto, E., S. Susilowati, S. Tasminatun, R. Murwanti dan Sugiyanto. 2007. Efek kemopreventif ekstrak etanolik *Gynura procumbens* (Lour), Merr pada karsinogenesis kanker payudara tikus.

- Majalah Farmasi Indonesia, 18(3), 154-161.
- Novalina. 2003. Penggunaan Tanaman Obat Sebagai Upaya Alternatif dalam Terapi Kanker. Pengantar ke Falsafah Sain. PPS Institut Pertanian Bogor.
- Papetti, M. and I.M. Herman. 2002. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C947-C970.
- Prior, B. M., H.T. Yang and R. L. Terjung. 2004. What makes vessels grow with exercise training. *J App Physiol* 97: 1119-28.
- Puspita, N., M. Ardiani, A.G. Fina, E. P. Septisetyani dan E. Meiyanto. 2002. Ekstrak etanolik kulit jeruk mandarin (*Citrus reticulata*) meningkatkan ekspresi faktor angiogenik VEGF pada sel kanker kolon WiDr. Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC). Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada
- Rafii, S. 2002. Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. *J. Gene Ther.* 9: 631-641
- Ribatti, D., A. Gulantris., M. Bastaki., A. Vacca., M. Iurlaro., L. Roncali., and Presta, M., 1997, New Model for the Study of Angiogenesis and Antiangiogenesis in the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane: The Gelatin Sponge/Chorioallantoic Membrane Assay, *Journal of Vascular Research*, 34:455-463.
- Wen-fu, T., Li-ping, L., Mei-hong, L., Yi-Xiang, Z., Yun-guang, T., Dong, X and Jian, D. 2002. Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential. *European Journal of Pharmacology*. Vol 459. 255-262.