

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK RIMPANG KUNYIT PUTIH
(*Curcuma zedoria*) TERHADAP EKSPRESI CASULAR
ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)
PADA PEMBULUH DARAH MEMBRAN
KORIOALANTOIS TELUR
AYAM BEREMBRIO**



Oleh :

ANICETUS SAVIO MUTU

NIM 060810421

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2012**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK RIMPANG KUNYIT PUTIH
(*Curcuma zedoria*) TERHADAP EKSPRESI VASCULAR
ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)
PADA PEMBULUH DARAH MEMBRAN
KORIOALANTOISTELUR
AYAM BEREMBRIO**

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh

ANICETUS SAVIO MUTU

NIM 060810421

Menyetujui
Komisi Pembimbing,


(Agus Sunarso, M.Sc., drh)
Pembimbing Pertama


(Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S., drh)
Pembimbing Kedua

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul:

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK RIMPANG KUNYIT PUTIH
(*Curcuma zedoria*) TERHADAP EKSPRESI VASCULAR
ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)
PADA PEMBULUH DARAH MEMBRAN
KORIOALANTOIS TELUR
AYAM BEREMBRIO**

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu 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 disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 04 September 2012



ANICETUS SAVIO MUTU
NIM. 060810421

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal: 14 September 2012

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Dr. Iwan Sahrial Hamid, M.Si., drh

Sekretaris : Hana Eliyani, M.Kes., drh

Anggota : Dr. Suwarno, Msi., drh

Pembimbing I : Agus Sunarso, M.Sc., drh

Pembimbing II : Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S., drh

Telah diuji pada

Tanggal: 21 September 2012

KOMISI PENILAI SKRIPSI

Ketua : Dr. Iwan Sahrial Hamid, M.Si., drh

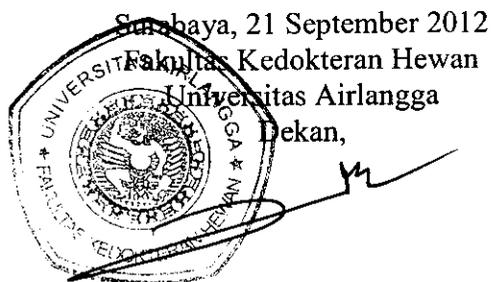
Sekretaris : Hana Eliyani, M.Kes., drh

Anggota : Dr. Suwarno, Msi., drh

Pembimbing I : Agus Sunarso, M.Sc., drh

Pembimbing II : Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S., drh

Surabaya, 21 September 2012
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh.
NIP. 195312161978062001

Effect of white turmeric rhizome (*Curcuma zedoria*) extraction the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) In blood vessels chorioallantoic membrane of embryonated chicken eggs

Anicetus savio mutu

ABSTRACT

Angiogenesis is the most important for cancer growth, since angiogenesis serves to supply oxygen and nutrition for cancerous cells. Therefore inhibition of angiogenesis is one of strategy for treating cancer. This study was aim to determine the activity of various doses of *Curcuma zedoria* extract as an anti-angiogenesis through barriers VEGF expression in vascular endothelial cell on chorioallantoic membrane of embryonated chicken eggs. Embryonated chicken eggs used were nine days old, were treated by bFGF and ethanolic extract of white turmeric rhizome. All embryonated chicken eggs used were incubated for three days and than observed the angiogenesis response.

Based on research conducted showed that ethanolic extract of white turmeric (*Curcuma zedoria*) is able to inhibit angiogenesis in TAB proportional to the dose of the extract tested. Angiogenesis response to doses of 60,75,90 and 110 μg each sequence is equal (in%) $123.00^d \pm 13.63$, $96.00^c \pm 7.78$, and $60.00^b \pm 7.48$, $42, 00^a \pm 10.98$ ($P < 0.05$). These results indicate that the ethanolic extract of white turmeric (*Curcuma zedoria*) have anti- angiogenic effects.

Keywords: antiangiogenesis, *Curcuma zedoria*, VEGF, bFGF.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan berkat-Nya sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul **Pengaruh Pemberian Ekstrak Rimpang Kunyit Putih Terhadap Ekspresi Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Pada Pembuluh Darah Membran Korioalantois Telur Ayam Berembrio.**

Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya Prof. Hj. Romziah Sidik., Ph.D., drh., atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Bapak Agus Sunarso, M.Sc., drh., selaku dosen pembimbing utama dan Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S., drh., selaku dosen pembimbing serta, atas saran dan bimbingannya sampai selesainya skripsi ini.

Dr. Iwan Sahrial Hamid, M.Si., drh., selaku dosen pembimbing penelitian dan dosen penguji atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti penelitian dan bimbingannya dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini.

Ibu Hana Eliyani, M.kes., drh dan Dr. Suwarno, M.Si., drh., selaku dosen penguji, atas saran dan bimbingan yang telah diberikan sampai selesainya penulisan skripsi ini.

Ibu Ratna Damayanti, M.Si., drh., selaku dosen wali., atas segala nasehat dan bimbingan yang diberikan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Seluruh staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Rasa Hormat dan Terima kasih yang tak terhingga penulis sampaikan kepada orangtua Bpk. Sabinus Jas dan ibunda tercinta Emiliana Nene, atas segala dukungan dan doa yang tidak pernah berhenti.

Rekan dan sahabat penulis Jonathan Fandri, Klemes Petrik, teman-teman kos dan seluruh teman angkatan 2008 yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, terima kasih atas segala bantuan, dukungan, serta kerjasama yang telah diberikan.

Semua pihak lain yang telah membantu penulis dalam penyusunan skripsi ini baik langsung maupun tidak langsung. Akhirnya penulis berharap semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Surabaya, September 2012

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
HALAMAN IDENTITAS	iv
ABSTRACT	vi
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang.....	1
1.2 Rumusan masalah	4
1.3 Landasan teori.....	5
1.4 Tujuan penelitian.....	7
1.5 Manfaat penelitian	7
1.6 Hipotesis.....	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Angiogenesis pada proses karsinogenesis.....	8
2.2Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	11
2.3Kunyit putih (<i>Curcuma zedoria</i>).....	13
2.3.1Klasifikasi tanaman.....	13
2.3.2 Morfologi tanaman.....	14
2.3.3 Kandungan kimia dan manfaat.....	15
BAB III MATERI DAN METODE	17
3.1 Tempat dan waktu penelitian	17
3.2 Bahan dan materi penelitian	17
3.2.1 Bahan penelitian.....	17
3.2.1.1Telur Ayam Berembrio(TAB).....	17
3.2.1.2 Tanaman.....	18
3.2.1.3 Induktor Angiogenesis.....	18
3.2.1.4 Bahan kimia	18
3.2.2 Alat penelitian	18
3.3 Metode penelitian.....	19

3.3.1 pembuatan ekstrak rimpang kunyit putih (<i>Curcuma zedoria</i>).....	19
3.3.2 Induksi angiogenesis dan <i>Basic Fibroblast Growth</i> <i>Faktor</i> (bFGF).....	20
3.3.3 Pembuatan larutan uji	20
3.3.3.1 Penyiapan subyek uji	20
3.3.3.2 Implantasi larutan uji ke dalam telur	21
3.3.4 pembuatan sediaan imunohistokimia	23
3.4 Rancangan penelitian	25
3.5 Variabel penelitian	25
3.6 Analisis data	25
3.7 Alur penelitian	26
BAB IV HASIL PENELITIAN.....	27
BAB V PEMBAHASAN	33
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	37
6.1 Kesimpulan.....	37
6.2 Saran	37
RINGKASAN.....	38
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN	45

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rerata jumlah ekspresi VEGF pada setiap kelompok perlakuan	31

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Proses perkembangan kanker.....	9
2.2 Interaksi antara ligan VEGF dan reseptor.....	12
2.3 Tanaman (<i>Curcuma zedoria</i>) /.....	14
4.1 Gambaran makroskopis pembentukan pembuluh darah sekitar paper dish	28
4.2 Ekspresi VEGF pada sel endotel pembuluh darah membran korioalantois TAB	29

DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

bFGF	= <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
CAM	= <i>Chorioallantois Membrane</i>
CEPs	= <i>Circulating Endothelial progenitor Cells</i>
DMSO	= <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DAB	= <i>Dimetil Amino Benzene</i>
Dpl	= <i>Dari Permukaan Laut</i>
EGF	= <i>Epidermal Growth Faktor</i>
HIF	= <i>Hypoxia Inducible Faktor</i>
MMPs	= <i>Matrix metalloproteinases</i>
PDGF	= <i>Platelet Derivet Growth</i>
SPF	= <i>Spesific Patogen Free</i>
TAB	= <i>Telur Ayam Berembrio</i>
TNF α	= <i>Tumor Necrosis Faktor</i>
VEGF	= <i>Vascular Endothelial Growrh Faktor Faktor</i>
μ g	= <i>Micro Gram</i>
μ l	:= <i>Micro liter</i>
ng	= <i>Nano gram</i>
$^{\circ}$ C	= <i>Derajat celcius</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Kanker merupakan suatu penyakit yang ditandai oleh adanya pertumbuhan sel jaringan tubuh yang tidak normal dan tidak terkontrol. Sel terbentuk akibat terjadinya mutasi gen sehingga mengalami perubahan baik bentuk, ukuran maupun fungsi dari sel tubuh asalnya. Mutasi gen ini dipicu oleh suatu bahan yang dapat berupa bahan tambahan makanan, radioaktif, oksidan, atau karsinogenik yang dihasilkan oleh tubuh akibat proses gangguan imunitas (Griffiths *et al.*, 1993).

Insidensi kanker pada hewan banyak dialami oleh anjing dan kucing, yaitu kanker kelenjar *mammae* yang menempati 5 sampai 7 persen populasi hewan betina, sedangkan peringkat kedua adalah kanker kulit. Anjing betina pengidap kanker kelenjar *mammae* sebanyak 50% bersifat *benigna* dan 50% bersifat *maligna*. Kejadian kanker kelenjar *mammae* pada kucing tampaknya jarang terjadi, namun dari keseluruhan kasus kanker *mammae* pada kucing terdapat 85% bersifat *maligna* dan sifatnya *benigna* (Liptak, 2004).

Karsinogenesis merupakan proses yang berjalan dalam berbagai tahap atau yang disebut proses *multistep*. Karsinogen menimbulkan perubahan pada DNA yang satuan terkecilnya adalah gen. Terdapat enam ciri khas perubahan yang terjadi pada sel normal menjadi sel *maligna* yaitu 1) sel kanker mampu mencukupi kebutuhan sinyal pertumbuhannya sendiri, 2) tidak sensitif terhadap sinyal anti pertumbuhan, 3) dapat menghindar dari mekanisme apoptosis,

4) memiliki potensi yang tidak terbatas untuk bereplikasi, 5) mampu mencukupi kebutuhan oksigen dan nutrisinya sendiri melalui pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) serta 6) mampu menginvasi jaringan sekitarnya dan dapat bermetastasis (Hanahan and Weinberg, 2000).

Angiogenesis mengacu pada proses pembentukan pembuluh darah baru. Ketika jaringan membutuhkan oksigen lebih banyak, sel tumor melepaskan molekul yang mendorong pertumbuhan pembuluh darah. Angiogenesis adalah proses kompleks yang dimediasi oleh sel endotel yang melapisi pembuluh darah (Daniel and Abrahamson, 2000).

Angiogenesis menjadi proses penting dalam pertumbuhan kanker. Angiogenesis menjadi indikator adanya perubahan status sel kanker dari *benigna* menjadi *maligna*. Sel kanker diketahui bersifat *maligna* apabila sudah berukuran lebih dari 2 mm³ (Berges, *et al.*, 2002). Perkembangan sel kanker terutama yang bersifat *maligna* mengindikasikan terbentuknya angiogenesis dengan mengaktifkan beberapa faktor pertumbuhan seperti *Vascular Endothelial Growth Faktor* (VEGF), *Basic Fibroblast Growth Faktor* (bFGF), *Platelet Derivet Growth factor* (PDGF), *Epidermal Growth Faktor* (EGF) dan *Tumor Necrosis Factor* (TNF α) (Papetti and Herman, 2002).

Vascular Endothelial Growth Faktor diketahui mempunyai kontribusi besar terhadap angiogenesis. Regulasi VEGF melibatkan komponen besar dalam merespon aktivitas fisiologis dan perannya pada angiogenesis diduga sangat penting untuk perbaikan kerusakan pembuluh darah (Robinson, *et al.*, 2004).

Penggunaan obat antiangiogenesis yang telah dikembangkan oleh beberapa peneliti diantaranya Celestrol, Bevacizumab, Trombospodin dan Tumstatin. tampaknya bersifat selektif, artinya hanya efektif untuk tahap tertentu saja dari keseluruhan proses angiogenesis. Misalnya Bevacizumab menghambat faktor pertumbuhan VEGF dan Tumstatin menghambat proliferasi sel endotel, sedangkan proses angiogenesis sangat kompleks meliputi berbagai tahap, seperti aktivasi faktor pertumbuhan, proliferasi, migrasi, pembentukan *tube formation*, aktivasi enzim matriks proteinase yang semuanya saling terkait (Kerbel and Folkman, 2002).

Pengobatan dengan cara modern masih dirasa banyak memberikan efek samping, sedangkan persentase keberhasilannya belum cukup maksimal, sehingga perlu ditunjang dengan pengobatan alternatif. Penggunaan obat asal tanaman menjadi alternatif dalam upaya pencegahan kanker melalui penghambatan angiogenesis. Salah satu bahan alami yang digunakan sebagai pengobatan kanker melalui penghambatan angiogenesis adalah rimpang kunyit putih (*Curcuma zedoaria*) (Anas, 2010).

Curcuma zedoaria mempunyai kandungan kurkuminoid, minyak atsiri serta polisakarida golongan lain, ini terutama terdapat pada bagian rimpang, sedangkan pada batangnya terdapat senyawa flavonoid, saponin dan polifenol. Kurkuminoid meliputi : kurkumin, demetoksikurkumin, bisdemetoksikurkumin dan 1,7-bis (4-hidroksifenil)-1,4,6-heptatrien-3-on (Syu *et al.*, 1998; Jang *et al.*, 2001). Senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa yang dapat bertindak

sebagai anti-oksidan, penghambatan karsinogenesis, menghambat proliferasi sel, anti-estrogen serta sebagai antiangiogenesis.

Kunyit putih sebagai *Family Curcuma*, mengandung zat kurkumin. Dalam buku *Encyclopedia of Medical Plants* dinyatakan, kurkumin mempunyai khasiat anti-oksidan dan anti-inflamasi. Bahkan khasiat anti-oksidannya lebih kuat dari vitamin E sedangkan khasiat anti-inflamasinya lebih kuat dari pada hidrokortison kimia/sintetis (Chen *et al.*, 2011).

Angiogenesis tidak terlepas dari peran besar faktor pertumbuhan, maka sebagai fokus utama dalam penelitian ini akan diamati ekspresi VEGF sebagai factor pertumbuhan angiogenesis. Pengamatan dilakukan dengan memberi ekstrak rimpang *Curcuma zedoria* dalam berbagai dosis pada endotel dari pembuluh darah membrane korioalantois telur ayam berembrio yang diinduksi dengan bFGF.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang penelitian penggunaan ekstrak *Curcuma zedoria* sebagai anti angiogenesis, maka dapat ditarik suatu permasalahan :

- A. Apakah pemberian ekstrak *Curcuma zedoria* dapat menghambat ekspresi VEGF pada sel endotel pembuluh darah membran korioalantois Telur Ayam Berembrio (TAB)?
- B. Apakah pemberian ekstrak *Curcuma zedoria* dalam berbagai dosis dapat menghambat antiangiogenesis?

1.3 Landasan Teori

Kanker merupakan suatu penyakit yang ditandai oleh adanya pertumbuhan sel jaringan tubuh yang tidak normal dan tidak terkontrol. Pertumbuhan kanker tergantung dari sel kanker dan lingkungan sekitar yang mendukung pertumbuhan kanker itu sendiri. Semua jenis kanker membutuhkan suplai darah dan oksigen yang cukup untuk mendukung perkembangannya. Oleh karena itu, sel kanker akan mengembangkan suatu sistem pada lingkungan di sekitarnya untuk mengarahkan pertumbuhan pembuluh darah yang telah ada menuju ke sel kanker itu sendiri, dan peristiwa ini disebut sebagai proses “angiogenesis” (Anas, 2010).

Berdasarkan penelitian sebelumnya *Curcuma zedoria* memiliki kandungan kimia senyawa antikanker yaitu kurkuminoid (diarilheptanoid), minyak atsiri, polisakarida serta golongan lain. Diarilheptanoid yang telah diketahui meliputi kurkumin, demetoksikurkumin, bisdemetoksikurkumin, dan 1,7 bis (4-hidroksifenil)-1,4,6-heptatrien-3-on, yang bisa menghambat proses angiogenesis (Windono dan parfiati, 2002).

Angiogenesis adalah proses pembentukan pembuluh darah baru yang terjadi secara normal dan sangat penting dalam proses pertumbuhan dan perkembangan. Angiogenesis juga terlibat dalam proses penyembuhan, seperti pembentukan jaringan baru setelah cedera. Akan tetapi angiogenesis juga merupakan langkah yang sangat penting dalam karsinogenesis atau pertumbuhan sel kanker (angiogenesis) sehingga terjadi perkembangan sel kanker yang tidak terkendali dan bersifat ganas (Folkman, 1998).

Angiogenesis juga akan berkembang menjadi sesuatu yang bersifat patologis dan berhubungan dengan kanker, inflamasi, penyakit kulit dan penyakit mata. Kondisi patologis angiogenesis ini dikarakterisasi oleh pembentukan pembuluh darah baru dan penghancuran sel normal yang ada disekitarnya. Angiogenesis patologis adalah pembentukan pembuluh darah baru yang tidak normal, dimana tubuh akan kehilangan kontrol dalam mengatur keseimbangan sekresi *angiogenic stimulator* dan *inhibitor*. Sebagai akibatnya adalah terjadinya pembentukan pembuluh darah yang baru dengan sangat cepat dalam pola yang sangat tidak terkontrol (Muslichah, 2010).

Salah satu cara dalam terapi kanker adalah dengan menghambat peristiwa angiogenesis. Penghambatan pembentukan pembuluh darah baru telah banyak dilakukan untuk beberapa indikasi, diantaranya adalah dengan menghambat angiogenesis pada pertumbuhan sel kanker. Beberapa mekanisme kerja (*Angiogenesis Inhibitor*) dapat dilihat pada Gambar. salah satunya adalah dengan menghambat kerja VEGF dan atau memblokir reseptor VEGF (VEGFR-1 dan VEGFR-2) (Anas, 2010).

Anti angiogenesis (*Angiogenesis Inhibitor*) dalam *Cancer Chemotherapy* dikembangkan dengan dua cara, yaitu (1) target utama adalah terhadap faktor angiogeniknya dan (2) adalah terhadap reseptornya. Mekanismenya adalah dengan menghambat aktivitas molekul faktor angiogenik yang akan menginduksi enzim ekstrasellular matriks yang akan menyerang dinding sel endotel pembuluh darah dan menghambat proliferasi sel endotel pembuluh (Anas, 2010).

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan mengetahui aktivitas ekstrak *Curcuma zedoria* sebagai anti angiogenesis dalam berbagai dosis melalui hambatan ekspresi VEGF pada sel endotel pembuluh darah membran korioalantois TAB yang diinduksi bFGF dengan menggunakan metode imunohistokimia.

1.5 Manfaat Penelitian

- A. Hasil penelitian dapat bermanfaat untuk mengetahui kinerja ekstrak rimpang *Curcuma zedoria* sebagai anti angiogenesis melalui pengamatan ekspresi VEGF
- B. Hasil penelitian dapat bermanfaat untuk mengetahui khasiat ekstrak rimpang *Curcuma zedoria* sebagai anti angiogenesis.

1.5.1 Hipotesis

Hipotesis yang dapat diajukan pada penelitian ini adalah ekstrak akar *Curcuma zedoria* dapat menghambat angiogenesis dengan menghambat ekspresi VEGF pada endotel pembuluh darah membran korioalantois TAB yang diinduksi bFGF.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

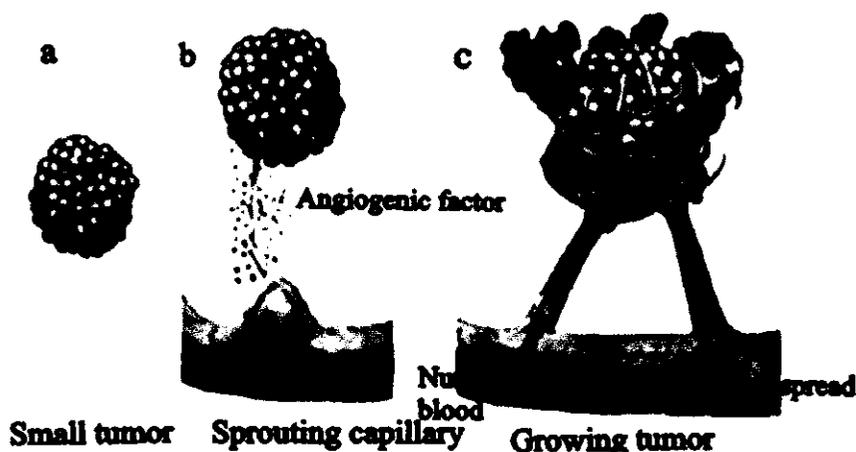
2.1 Angiogenesis pada Proses Karsinogenesis

Angiogenesis adalah proses pembentukan pembuluh darah baru yang terjadi secara normal dan sangat penting dalam proses pertumbuhan dan perkembangan. Angiogenesis juga terlibat dalam proses penyembuhan, seperti pembentukan jaringan baru setelah cedera. Akan tetapi angiogenesis juga merupakan langkah yang sangat penting dalam karsinogenesis atau pertumbuhan sel kanker sehingga terjadi perkembangan sel kanker yang tidak terkendali dan bersifat ganas (Folkman, 1998).

Angiogenesis patologis adalah pembentukan pembuluh darah baru yang tidak normal, dimana tubuh akan kehilangan kontrol dalam mengatur keseimbangan sekresi *angiogenics stimulator* dan *inhibitor*. Sel kanker akan memproduksi *angiogenics inhibitor factor* dalam jumlah yang banyak dimana efeknya adalah terjadinya pembentukan pembuluh darah yang baru dengan sangat cepat dalam pola yang sangat tidak terkontrol (Anas, 2010).

Dalam angiogenesis patologis, sel kanker akan membentuk dua lingkungan utama yaitu : 1) kanker mikrovaskular dan 2) kanker mikroenvironment, dimana kedua lingkungan ini akan mendukung proses pembentukan pembuluh darah baru. Sebagai akibatnya, aliran oksigen, nutrisi dan faktor pertumbuhan serta pembuangan sisa metabolisme sel kanker sangat efisien, dan mendukung pertumbuhan sel kanker menjadi progresif. Selain itu pembuluh darah juga merupakan tempat untuk berpindahny sel kanker dari

tempat yang satu ke tempat yang lainnya (metastasis). Proses ini akan terlihat dalam ilustrasi gambar dibawah ini (Konerding *et al.*, 2002).



Gambar 2.1. Proses perkembangan kanker (Konerding *et al.*, 2002).

Gambar 2.1 menerangkan proses perkembangan kanker dengan beberapa tahap yaitu : (A). Sel kanker dengan ukuran diameter < 1 mm mendapatkan pasokan oksigen dan nutrisi dari host vasculature. (B) Sel kanker yang lebih besar membutuhkan aliran darah baru, sel kanker melepaskan faktor angiogenesis yang akan menstimulasi perpindahan, proliferasi dan pembentukan pembuluh darah dari sel endotel yang terletak didekat pembuluh darah yang telah ada. (C) Pembuluh darah mengalir langsung pada sel kanker dari pembuluh darah utama untuk mendukung pertumbuhan sel kanker yang progresif (Konerding,*et al.*, 2002).

Pertumbuhan sel kanker yang sangat cepat akan menyebabkan sel tersebut kekurangan oksigen (hypoksia), oleh karena itu sel kanker akan merespon dengan mengekspresikan *Hypoxia inducible factor* (HIF). Dalam keadaan hipoksia, HIF akan masuk dan terakumulasi dalam nucleus, dimana HIF ini merupakan signal

transduksi ekspresi gen beberapa protein yang penting bagi sel kanker dalam menginduksi peristiwa angiogenesis sel endotel (Muslichah,2010).

Adanya pembuluh darah baru sangat menentukan perkembangan kanker. Tumor yang berukuran 1-2mm³ akan membentuk pembuluh darah baru karena dalam proliferasinya, sel kekurangan oksigen dan nutrisi untuk pertumbuhannya, sehingga diperlukan pertumbuhan pembuluh darah baru yang dapat membawa oksigen dan nutrisi ke daerah kanker (Bergers *et al.*, 2002).

Angiogenesis memegang peranan yang sangat penting pada perkembangan dari hipoplasia menjadi neoplasia. Neovaskularisasi juga mempengaruhi penyebaran sel kanker ke bagian tubuh lainnya, khususnya dalam memacu terjadinya metastasis. Tingkat vaskularisasi dari kanker menjadi indikator terjadinya metastasis (Anas, 2010)

Pertumbuhan sel-sel kanker dapat dihambat melalui hambatan metastasis sehingga diperlukan anti angiogenesis agar sel-sel kanker tidak mendapatkan pasokan oksigen dan nutrisi yang cukup. Beberapa tahapan dalam penghambatan angiogenesis, antara lain penghambatan *endogenous angiogenic factor* seperti bFGF, VEGF, dan *Circulating Endothelial Progenitor Cells* (CEPs); menghambat enzim degradasi *matrix metalloproteinases* (MMPs) yang bertanggung jawab terhadap degradasi membran basal pembuluh darah; menghambat proliferasi sel endotel; menghambat perpindahan sel endotel serta menghambat aktivasi dan diferensial sel endotel (Stegmann, 1998).

Angiogenesis adalah proses utama pada perkembangan normal dan perbaikan patologis. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-A) dapat

menstimulasi baik angiogenesis fisiologis dan patologis. VEGF-A adalah ligan untuk dua reseptor tirosin kinase VEGFR-1 (Flt-1) dan VEGFR-2 (KDR/Flk-1). Sebagian besar fungsi biologis VEGF-A yang dimediasi melalui VEGFR-2, sedangkan peran VEGFR-1 sebagian besar tidak diketahui. Aktifasi *mitogen-activated kinase, stress-activated kinase, protein kinase C, and the Akt pathway* merupakan peran VEGF-A, termasuk kelangsungan hidup sel, proliferasi, generasi oksida nitrat, dan induksi angiogenesis (Kliche and Waltenberger, 2001).

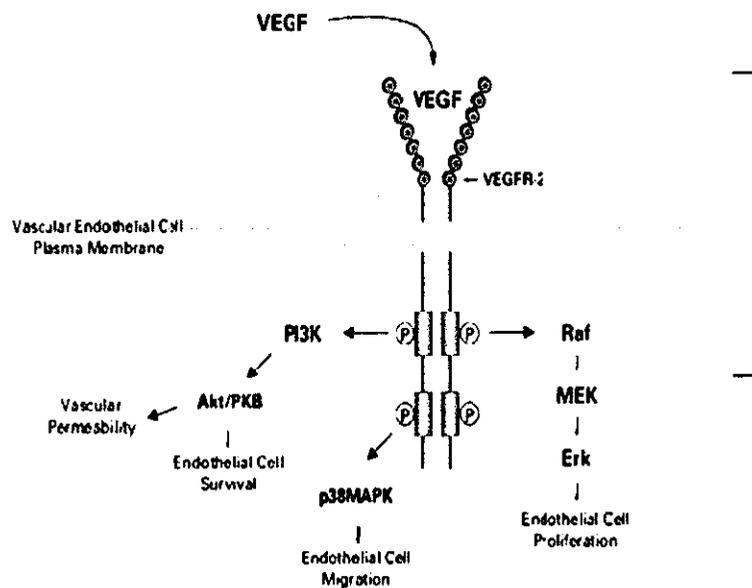
2.2 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) atau faktor pertumbuhan pembuluh darah adalah protein yang merangsang pertumbuhan, daya tahan dan penggandaan sel endothel pembuluh darah. VEGF membantu proses angiogenesis, meningkatkan pemeliharaan pembuluh darah sehingga bisa memastikan sel darah yang masih muda dapat bertahan hidup juga berperan dalam perpindahan sel untuk mencegah proses kematian sel secara normal (Rifa'I, 2009).

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 mengaktivasi VEGF membentuk angioblast, selanjutnya angioblast berdeferensiasi menjadi sel endotel yang bermigrasi ke arah tepi lumen pembuluh darah (Papetti and Herman, 2002).

Beberapa kelas VEGF diklasifikasikan diantaranya VEGF-A, PlGF, VEGF-B, VEGF-C, dan VEGF-D. Jenis VEGF yang paling penting pada angiogenesis adalah VEGF-A atau sering diistilahkan VEGF saja. Peran VEGF pada angiogenesis meliputi peningkatan migrasi sel endotel, peningkatan mitosis sel endotel, peningkatan aktivitas methane monooxygenase, peningkatan aktivitas $\alpha\beta_3$, penyusunan lumen pembuluh darah, kemotaktik untuk makrofag dan *granulocytes* dan vasodilatasi secara tidak langsung melalui pengeluaran NO atau EDRF (Papetti and Herman, 2002). Gambar tentang interaksi ligan VEGF dengan reseptor VEGF tampak pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Interaksi antara Ligan VEGF dan Reseptor VEGF (Rini, *et al.*, 2005).

VEGF merangsang pertumbuhan tumor dengan beberapa tahap, yaitu 1) VEGF merangsang angiogenesis tumor. VEGF mengawali pertumbuhan pembuluh darah baru yang membawa oksigen dan nutrisi sehingga tumor bisa membesar. Metastase terjadi akibat perpindahan sel tumor melalui pembuluh darah baru ke bagian tubuh yang lain. 2) VEGF membentuk jaringan pembuluh darah tumor yang abnormal. Pembuluh darah tumor yang abnormal memiliki fungsi dan struktur yang abnormal pula. VEGF memberikan sinyal ke pembuluh darah secara normal dan juga meningkatkan permeabilitas dinding sel. Pencegahan kematian sel pembuluh darah mengakibatkan tumbuh dan berkembangnya jaringan pembuluh darah liar. 3) VEGF bisa menghambat respon kekebalan normal terhadap tumor (Farhat, 2009).

2.3.1 Kunyit Putih (*Curcuma zedoaria*)

2.3.1 Klasifikasi Tanaman

Klasifikasi dari tanaman kunyit putih sebagai berikut

Divisio : Spermathopyta

Subdivisio : Angiospermae

Kelas : Monocotyledonae

Ordo : Zingiberales

Famili : Zingiberaceae

Genus : *Curcuma*

Spesies *Curcuma zedoaria* (Berg) Rosc (Backer and Van den Brink, 1965)



. Gambar 2.3 Tanaman *Curcuma zedoaria* (Windono dkk, 2002).

2.3.2 Morfologi tanaman

Curcuma zedoria, di Indonesia sering disebut tanaman kunyit putih. Tumbuhan ini berasal dari Himalaya, India, dan terutama tersebar di negara-negara Asia meliputi China, Vietnam, dan Jepang. *Curcuma zedoaria* (Rosc) tumbuh liar di Sumatra (Gunung Dempo), di hutan jati Jawa Timur, banyak dijumpai di Jawa Barat dan Jawa Tengah, di ketinggian sampai 1000 dpl (Windono dkk, 2002).

Tumbuhan ini berupa terna tahunan, tinggi mencapai 2 m, tumbuh tidak berkelompok. Daun berbentuk lanset memanjang berwarna merah lembayung di sepanjang tulang tengahnya. Bunga keluar dari rimpang samping, menjulang ke atas membentuk bongkol bunga yang besar, mahkota bunga berwarna putih, dengan tepi bergaris merah tipis atau kuning, rimpang berwarna putih atau kuning muda, rasa sangat pahit (Windono dkk, 2002).

2.3.3 Kandungan Kimia dan Manfaat

Kandungan kimia rimpang *Curcuma zedoaria* terdiri dari kurkuminoid (diarilheptanoid), minyak atsiri, polisakarida serta golongan lain. Diarilheptanoid yang telah diketahui meliputi : kurkumin, demetoksikurkumin, bisdemetoksikurkumin, dan 1,7 bis (4-hidroksifenil)-1,4,6-heptatrien-3-on (Windono dkk, 2002). Minyak atsiri berupa cairan kental kuning emas mengandung : monoterpen dan sesquiterpen. Monoterpen terdiri dari monoterpen hidrokarbon (alfa pinen, D-kamfen), monoterpen alkohol (D-borneol), monoterpen keton (D-kamfer), monoterpen oksida (sineol). Sesquiterpen pada *Curcuma zedoaria* terdiri dari berbagai golongan dan berdasarkan penggolongan yang dilakukan terdiri dari : golongan bisabolen, elema, germakran, eudesman, guaian dan golongan spironolakton. Kandungan lain meliputi etil-p-metoksisinamat, 3,7-dimetilindan-5-asam karboksilat (Windono dkk, 2002).

Kandungan minyak astiri pada *Curcuma zedoria* berupa 1,8 cinco (18,5%), cymene (18,42%), α -phellandrene (14.9%). Pada penelitian efek *Curcuma zedoria* pada kanker sebelumnya, ekstrak etanol rimpang *Curcuma-zedoaria* menunjukkan aktivitas menghambat sel-sel OVCAR-3 (Cell-line kanker ovarium manusia). Isolasi yang dipantau dengan bioaktivitas hambatan terhadap sel OVSCAR-3 menghasilkan senyawa aktif demetoksi kurkumin (Windono dkk, 2002). Ekstrak etanol 70% turmeric memperlihatkan penghambatan pada sel normal dan bersifat sitotoksis pada sel lymphoma pada konsentrasi 0,4 mg/ml. Ekstrak etanol turmeric juga menunjukkan penghambatan fase mitosis pada sel

mamalia secara *in- vitro* dengan menghambat pembentukan kromosom (Mills and Bone, 2000).

Senyawa yang berpengaruh pada penghambatan karsinogenesis adalah kurkumin. Aktivitas anti kanker kurkumin dikaitkan dengan kemampuannya sebagai penghambat COX maupun pada jalur signaling sel, baik melalui pemacuan apoptosis maupun *cell cycle arrest* dengan mempengaruhi produk gen penekan tumor maupun *oncogene*. Selain itu, dikaitkan juga dengan kemampuannya sebagai antioksidan, penghambatan karsinogenesis, penghambatan proliferasi sel, anti estrogen, dan anti angiogenesis (Murwanti, 2004).

BAB 3

MATERI DAN METODE

BAB III MATERI DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 4 bulan mulai bulan Desember 2011 sampai bulan April 2012, di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta sebagai tempat pembuatan ekstrak etanol rimpang *Curcuma zedoria*; Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, sebagai tempat inkubasi TAB, penyimpanan bahan induksi, bahan uji, preparasi membran korioalantois, serta koleksi data; Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya sebagai tempat *candling* TAB; Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga sebagai tempat sterilisasi alat; Laboratorium invitro Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya sebagai tempat inplantasi TAB; Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Dr.Sardjito Yogyakarta sebagai tempat pembuatan sediaan imunohistokimia dan pengamatan ekspresi VEGF pada sel endotel TAB.

3.2 Bahan dan Materi Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

3.2.1.1 Telur Ayam Berembrio

Penelitian ini menggunakan TAB *Spesific Antibody Negative (SAN)* berumur sembilan hari sebagai bahan untuk uji anti angiogenesis. Telur Ayam Berembrio yang dipakai berasal dari PUSVETMA Surabaya.

3.2.1.2 Tanaman

Tanaman yang digunakan pada penelitian ini yaitu *Curcuma zedoria*. Bagian dari tanaman tersebut (rimpang) diambil secara acak dengan kondisi yang masih segar lalu diproses hingga mendapatkan ekstrak etanolnya. Ekstrak etanol *Curcuma zedoria* menggunakan empat seri dosis yaitu : 60, 75, 90 dan 110 µg.

3.2.1.3 Induktor Angiogenesis

Dalam penelitian ini, induktor angiogenesis yang digunakan adalah *recombinant human* bFGF yang dilarutkan dengan Tris-HCl pH 7,5.

3.2.1.4 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan diantaranya bahan untuk ekstraksi, yaitu *Dimethylsulfoxide* (DMSO) 2%, sebagai pelarut ekstrak, dan etanol 96%. Selain itu digunakan larutan buffer Tris-HCl 0,01 M dengan pH 7,5 sebagai pelarut bFGF, formalin 10% untuk mengawetkan membran korioalantois yang akan dibuat sediaan imunohistokimia, serta PBS, hidrogen peroksida, buffer sitrat, *normal mouse serum*, antibodi anti VEGF, antibodi IgG *rabbit*, *anti human Dimetil Amino Benzene* (DAB), hematoxilin eosin, etanol, xylol, gliserol gelatin sebagai bahan pembuatan sediaan imunohistokimia.

3.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini, untuk pembuatan ekstrak etanol *Curcuma zedoria* meliputi *rotary evaporator*, neraca elektrik (Shimadzu,

tipe LS-6DT), pH meter TOA HM-60S, dan *vortex* (B7600nBarnstead Thermolyne, IQWA USA). Peralatan untuk implantasi ke dalam membran korioalantois embrio ayam meliputi bor atau *mini drill*, karet penyedot (Brand), alat *candling*, mikropipet (eppendorf), *yellow tips*, *deck glass*, *Laminar Air Flow-hood* dari Famco, lampu spiritus, dan alat gelas (Pyrex). Inkubator (Lab Line Imperial III) untuk menginkubasi telur yang sudah diimplantasi dan termometer untuk mengukur suhu inkubator. Peralatan untuk preparasi jaringan membran korio alantois setelah inkubasi pinset, skalpel, dan gunting (Yamaco Stainless). Alat untuk pemeriksaan histologi yaitu mikroskop (Olympus CX-21).

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Pembuatan Ekstrak Rimpang Kunyit Putih (*Curcuma zedoaria*)

Rimpang *Curcuma zedoaria* dicuci bersih dengan air mengalir, ditiriskan, dijemur dengan panas matahari tidak langsung dengan ditutupi kain warna gelap. Setelah kering, dihaluskan dan diayak hingga diperoleh serbuk rimpang *Curcuma zedoaria*. Sebanyak 500 gram serbuk diekstrak dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 1,5 L. Pengadukan dilakukan 2 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 3 kali. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan kemudian diendapkan, lalu disaring untuk selanjutnya diuapkan dengan pengurangan tekanan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental (Hargono, 1986).

3.3.2 Induksi Angiogenesis dengan *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF)

Induksi pertumbuhan pembuluh darah baru pada membran korioalantois dilakukan dengan pemberian faktor angiogenesis yaitu bFGF. Induktor ini diberikan dengan konsentrasi bFGF 30 ng/ μ l. Dosis bFGF yang diaplikasikan pada telur adalah 30 ng, dengan volume pengambilan sebanyak 3 μ l dari stok bFGF dengan konsentrasi 10 ng / μ l (Dewi, 2011).

3.3.3 Pembuatan Larutan Uji

Ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* ditimbang sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dalam 2% DMSO dalam aquabidestilata steril sehingga diperoleh stok dengan konsentrasi 1 μ g/ μ l. Selanjutnya larutan uji disaring dengan *filter* 0,22 μ m, dimasukkan dalam flakon steril dan dibuat seri dosis. Dosis yang diinokulasikan pada TAB terdiri dari empat seri dosis yaitu : 60, 75, 90, 110 μ g per telur. Pembuatan larutan uji ini dilakukan dalam *Laminar Air Flow-hood* secara aseptis (Dewi, 2011).

3.3.3.1 Penyiapan Subyek Uji

Sedikitnya memiliki beberapa tahap dalam penyiapan subyek uji ini yaitu *candling* dan memberi tanda pada kerabang telur yang meliputi batas ruang udara, lokasi embrio, dan daerah yang akan dibuat lubang 1cm² diatas embrio. Kerabang telur pada bagian kutub yang mengandung ruang udara dan kerabang di atas embrio disterilkan dengan alkohol 70%. Pada kedua daerah tersebut kemudian dibuat lubang kecil dengan menggunakan sebuah *mini drill*. Udara dari

ruang udara dihisap dengan bola karet sampai membran korio alantois yang melekat pada membran telur lepas. Perlakuan ini dilakukan dengan posisi telur horizontal, diruang gelap dan menggunakan teropong sehingga membran korio alantois dan ruang udara buatan yang terbentuk di atas embrio dapat terlihat. Telur disterilkan lagi dan dimasukkan dalam *Laminer Air Flow-hood* dengan posisi horizontal dengan ruang udara buatan terletak dibagian atas selama 2 (dua) jam.

3.3.3.2 Implantasi Larutan Uji ke dalam Telur

Kerabang telur berembrio dipotong dengan gergaji (mini drill) hingga membentuk lubang dengan luas 1 cm². Melalui lubang ini larutan uji diimplantasi ke dalam *Chorioallantois Membrane*.

Subyek uji yang berupa telur di bagi dalam enam kelompok sebagai berikut :

Kelompok I: Kelompok Kontrol positif, empat TAB dengan pemberian induktor, yaitu bFGF sebanyak 30 ng dan pelarut Tris-HCl yang diimplantasikan ke dalam CAM melalui lubang pada ruang udara yang telah dipindahkan di atas posisi embrio.

Kelompok II: Kelompok kontrol negatif, empat TAB dengan pemberian pelarut Tris-HCl dan DMSO 2% yang diinokulasikan ke dalam CAM melalui lubang pada ruang udara yang telah dipindahkan di atas posisi embrio.

Kelompok III: Kelompok perlakuan, empat TAB dengan pemberian induktor, yaitu bFGF sebanyak 30 ng dan ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* sebanyak 60 µg dalam DMSO 2% yang diinokulasikan ke dalam CAM melalui lubang pada ruang udara yang telah dipindahkan di atas posisi embrio.

Kelompok IV: Kelompok perlakuan, empat TAB dengan pemberian induktor, yaitu bFGF sebanyak 30 ng dan ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* sebanyak 75 µg dalam DMSO 2% yang diinokulasikan ke dalam CAM melalui lubang pada ruang udara yang telah dipindahkan di atas posisi embrio.

Kelompok V: Kelompok perlakuan, empat TAB dengan pemberian induktor, yaitu bFGF sebanyak 30 ng dan ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* sebanyak 90 µg dalam DMSO 2% yang diinokulasikan ke dalam CAM melalui lubang pada ruang udara yang telah dipindahkan di atas posisi embrio.

Kelompok VI: Kelompok perlakuan, empat TAB dengan pemberian induktor, yaitu bFGF sebanyak 30 ng dan ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* sebanyak 110 µg dalam DMSO 2% yang diinokulasikan ke dalam CAM melalui lubang pada ruang udara yang telah dipindahkan di atas posisi embrio.

Setelah diberi perlakuan, kemudian TAB diinkubasi pada suhu 38⁰C dan kelembaban relatif 60% selama tiga hari atau 72 jam (Ribatti dkk, 1997). Setelah itu TAB dibuka dengan cara menggunting cangkang telur menjadi dua bagian

dimulai dari cangkang yang dekat dengan rongga udara. Isi TAB dikeluarkan perlahan agar membran korioalantois tetap melekat pada cangkang telur. Setelah itu membran korioalantois yang terdapat pembuluh darah dikoleksi pada buffer formalin. Selanjutnya dilakukan pembuatan sediaan imunohistokimia.

3.3.4 Pembuatan Sediaan Imunohistokimia

Membran korioalantois TAB yang terdapat pembuluh darah dimasukkan dalam blok parafin dipotong setebal 3-4 μm dan diletakkan di atas *slide* polylisin kemudian diinkubasi selama satu malam di inkubator pada suhu 45⁰C. Selanjutnya dilakukan deparafinisasi dengan xilen sebanyak tiga kali masing-masing selama 3 menit. Dilanjutkan dengan pencucian dengan fosfat bufer salin atau yang sering disebut dengan *phosphate buffer saline* (PBS) sebanyak tiga kali masing-masing selama 5 menit. Preparat kemudian direndam dalam 3% hidrogen peroksida (H_2O_2 dalam metanol) selama 20 menit, lalu dicuci dengan akuades dilanjutkan pencucian dengan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan *antigen retrieval* dengan melakukan perendaman preparat dalam bufer sitrat pH 6,0 di dalam *microwave*. Lalu dibiarkan dingin selama 20-30 menit lanjutkan dengan pencucian PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama 5 menit. Penambahan 0,1% protease selama 20 menit pada 37⁰C, didigesti dengan 100 $\mu\text{g/ml}$ proteinase K dalam buffer (0,01 mol/l trish HCl pH 7,8 0,005 mol/l EDTA dan 0,5% SDS) selama 15 menit. Setelah itu dicuci dengan PBS selama 10 menit. Preparat diinkubasikan dalam *normal mouse serum* selama 5 menit. Selanjutnya *normal mouse serum* dibersihkan (tanpa cuci), preparat ditetesi dengan antibodi

primer dalam antibodi *diluent* (perbandingan 1 : 50) IgG₁ (antibodi monoklonal anti VEGF) selama 60 menit atau satu malam dalam lemari es (8°C), kemudian dicuci dalam PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama 5 menit. Preparat diinkubasikan dengan antibodi sekunder *IgG rabbit anti human* selama 5 menit, lalu dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama 5 menit. Kemudian ditetesi dengan *streptavidin-peroksidase* selama 5 menit, lalu dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama 5 menit. Dilanjutkan dengan inkubasi dalam *Dimetil Amino Benzene* (DAB) selama 5-15 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir selama 10-15 menit, selanjutnya dilakukan *counterstain* dengan hematoxylin eosin selama 3-4 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir 10-15 menit. Rehidrasi secara bertingkat dilakukan dengan etanol absolut, etanol 95%, etanol 80% dan xylol sebanyak dua kali. Terakhir dilakukan pemberian *mounting media* (gliserol gelatin) sebelum ditutup dengan *deck glass*. Pembuatan sediaan imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit dr. Sardjito Yogyakarta.

3.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorik (*true-experimental research*) dengan menggunakan variabel bebas untuk mempengaruhi dampak akibat pada variabel tergantung, menggunakan subyek penelitian berupa TAB (telur ayam berembrio).

Rancangan penelitian pada eksperimental laboratorik ini merupakan *control group post-test only design* : untuk menyelidiki kemungkinan saling

hubungan sebab-akibat dengan cara mengenakan kepada satu atau lebih kelompok eksperimental, satu atau lebih kondisi perlakuan dan membandingkan hasilnya dengan satu atau lebih kelompok kontrol yang tidak dikenai kondisi perlakuan kelompok eksperimen dan kelompok kontrol dibentuk dengan prosedur random, sehingga keduanya dapat dianggap setara. Selanjutnya kelompok eksperimen diberikan perlakuan, setelah itu dilakukan pengukuran variabel terikat pada kedua kelompok tersebut dan hasilnya dibandingkan perbedaannya (Sugiyono,2010).

3.5 Variabel Penelitian

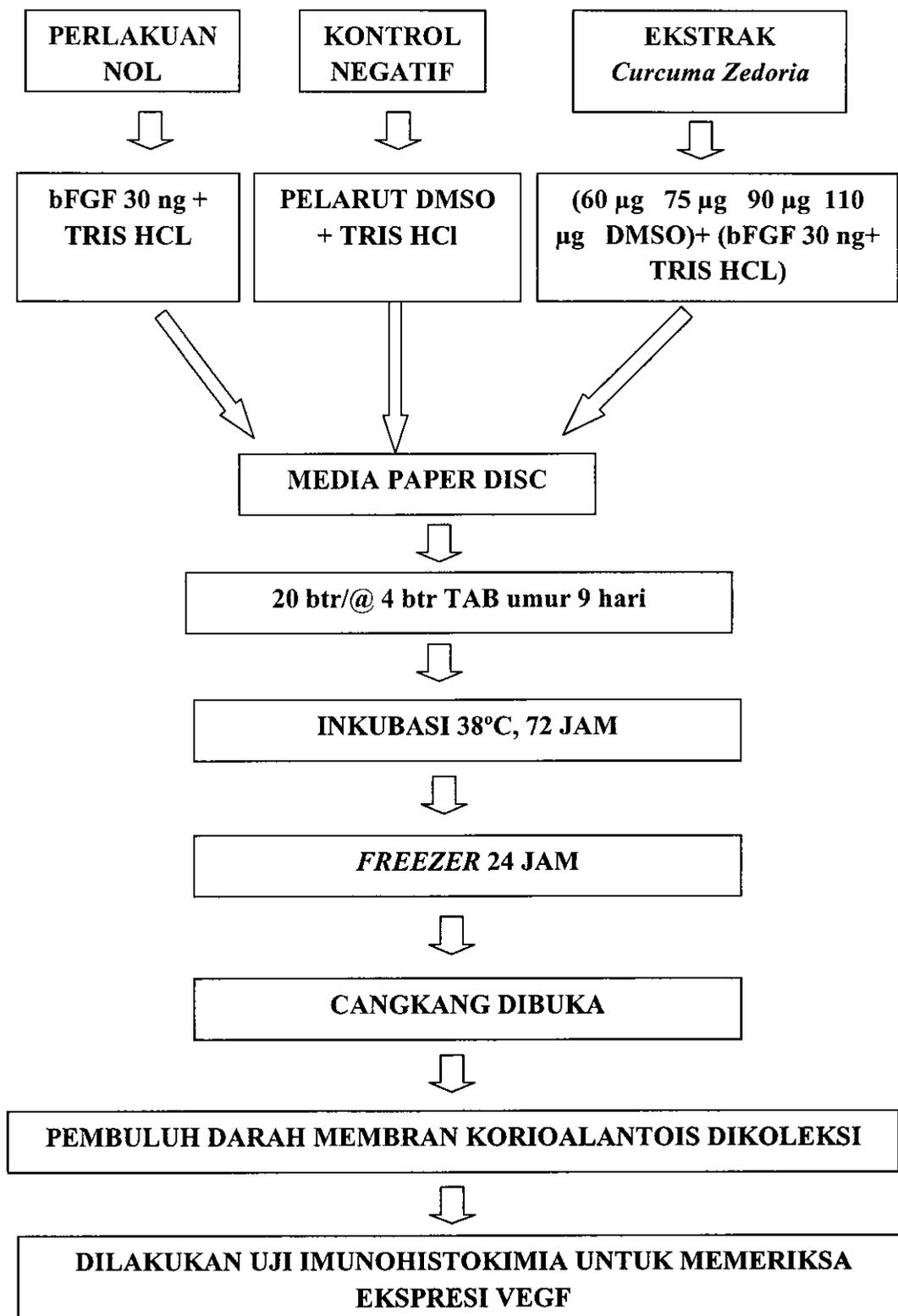
Beberapa peubah penelitian yang diperlukan dalam penelitian ini meliputi:

- Variabel Bebas : Ekstrak etanol *Curcuma Zedoria*
- Variabel Tergantung : Ekspresi VEGF pada sel endotel
- Variabel Kendali :Umur TAB, suhu dan kelembaban inkubator, bahan pelarut (DMSO), dan waktu inkubator.
-

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis ekspresi VEGF dengan *Analisis Varian* (Anava), dan bila terjadi perbedaan signifikan dilanjutkan uji perbandingan rerata setiap kelompok perlakuan dengan uji Jarak Berganda *Duncan*.

3.7 Alur Penelitian



BAB 4

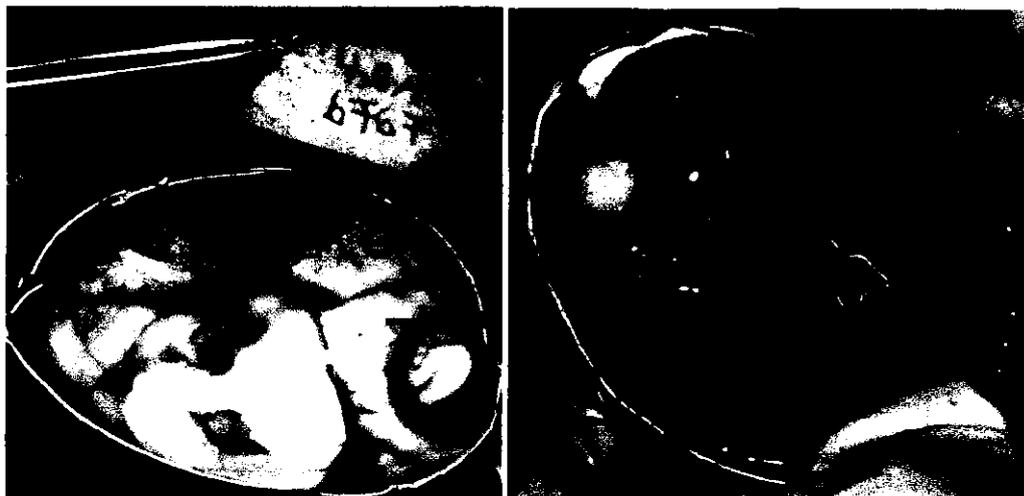
HASIL PENELITIAN

BAB 4 HASIL PENELITIAN

Peran pemberian bFGF dalam menginduksi pembentukan pembuluh darah baru pada membran korioalantois TAB, merupakan langkah awal untuk melakukan penelitian dan pengamatan tentang aktifitas tanaman kunyit putih (*Curcuma zedoria*) yang diduga dapat menghambat angiogenesis melalui hambatan ekspresi VEGF.

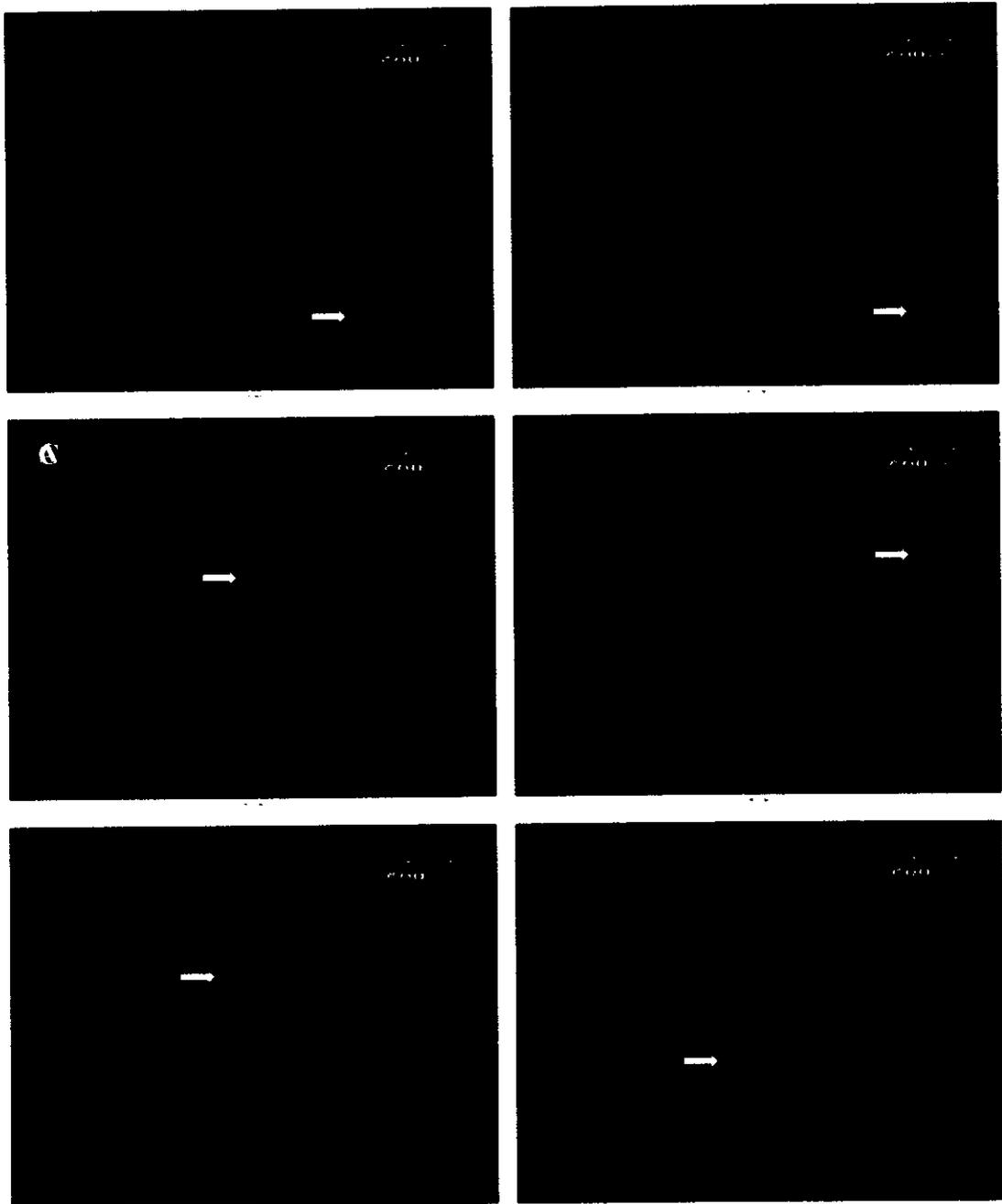
Vascular Endothelial Growth Factor merupakan regulator positif untuk angiogenesis yang aktivitasnya dipicu oleh bFGF. Pengamatan ekspresi VEGF dilakukan pada kelompok kontrol negatif placebo, kelompok perlakuan nol dan kelompok perlakuan ekstrak daun *Gynura procumbens* berbagai dosis yaitu 60, 75, 90 dan 110 µg pada setiap TAB.

Induksi bFGF dilakukan pada TAB umur sembilan hari, dengan cara diteteskan pada permukaan *paper dish* dan dimasukkan dalam TAB pada permukaan bintik pertumbuhan embrio. Hasil induksi angiogenesis oleh bFGF pada kelompok perlakuan nol telah menunjukkan adanya pembentukan pembuluh darah baru yang terbentuk di sekitar *paper dish* dan ada pula yang menjulur ke permukaan *paper dish*. Pembuluh-pembuluh dara baru merupakan hasil percabangan pertumbuhan dari pembuluh darah utama yang menjulur di sekitar *paper dish*. Hasil tersebut tidak ditemukan pada kelompok kontrol negatif yang hanya diberi placebo. Pernyataan ini tampak pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 : Gambaran pertumbuhan pembuluh darah baru disekitar *paper dish*.
 Keterangan: A) gambar dengan pertumbuhan pembuluh darah baru di sekitar *paper dish*.
 B) Tidak terdapat pertumbuhan pembuluh darah baru di sekitar *paper dish*. Tanda penah menunjukkan perkembangan ada tidaknya pembuluh darah baru sekitar *paper dish* (tampak warna putih).

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. Warna coklat membuktikan terjadi ekspresi VEGF pada sitoplasma sel yang diberikan inductor bFGF hal ini juga membuktikan peran DAB dalam proses *imunohistokimia* sehingga terjadi ekspresi VEGF pada sitoplasma sel endotel pembuluh darah. Hal tersebut sangat kontras bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif yang hanya diberi pelarut, lebih didominasi warna biru pada sitoplasma sel endotel. Penampakan warna biru memberi arti bahwa tidak ada ekspresi VEGF, dan angiogenesis yang terbentuk adalah angiogenesis normal dengan pertumbuhan pembuluh darah yang normal. Hasil gambaran ekspresi VEGF pada pemberian ekstrak rimpang kunyit putih semakin berkurang warna coklat seiring dengan peningkatan dosis ekstrak dari 60 μg sampai dengan 110 μg seperti yang tampak pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Gambaran imunohistokimia ekspresi VEGF pada sel endotel pembuluh darah membran korioalantois TAB dengan pembesaran 400x. Tanda panah menunjukkan ekspresi VEGF.

Keterangan : A) kelompok perlakuan nol bFGF 60 ng + Tris HCl dan DMSO dengan pembesaran 400x, B) kelompok kontrol negatif Tris HCl dan DMSO dengan pembesaran 400x, C) kelompok perlakuan ekstrak *C. zedoria* 60 µg+ bFGF 60 ng dengan pembesaran 400x, D) kelompok perlakuan ekstrak *C. zedoria* 75 µg+ bFGF 60 ng dengan pembesaran 400x, E) kelompok perlakuan ekstrak *C. zedoria* 90 µg+ bFGF 60 ng, F) kelompok perlakuan ekstrak *C. zedoria* 110 µg+ bFGF 60 ng.

Hasil pengamatan mikroskopis ekspresi VEGF dilanjutkan dengan melakukan penghitungan terhadap sel endotel yang tampak berwarna coklat. Penghitungan dilakukan terhadap tiga lapang pandang. Tiga lapang pandang dianggap cukup untuk mewakili perhitungan rerata ekspresi VEGF, karena TAB sangat banyak sel endotel yang tumbuh. Pengamatan sediaan imunohistokimia ekspresi VEGF pada mikroskop tampak adanya penumpukan ekspresi VEGF, karena itu teknik perhitungannya dihitung satu atau tidak dihitung sama sekali.

Data perhitungan 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 $p = 0.363$, 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 *Curcuma zedoria* 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 *Curcuma zedoria* dengan berbagai dosis terhadap jumlah VEGF yang diekspresikan pada sel endotel pembuluh darah baru korioalantois TAB.

Terdapat 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 4.1.

Table 4.1 Rerata jumlah ekspresi VEGF pada setiap kelompok perlakuan

No	Kelompok Perlakuan	Rerata
I	Kontrol negatif (Tris HCl dan DMSO)	57,25 ^{ab} ± 4,34
II	Perlakuan Nol (bFGF 60 ng + Tris HCl dan DMSO)	137,00 ^d ± 15,51
III	Perlakuan I (Ekstrak <i>C. zedoria</i> 60 µg+ bFGF 60 ng)	123,00 ^d ± 13,63
IV	Perlakuan II (Ekstrak <i>C. zedoria</i> 75 µg+ bFGF 60 ng)	96,00 ^c ± 7,78
V	Perlakuan III (Ekstrak <i>C. zedoria</i> 90 µg+ bFGF 60 ng)	60,00 ^b ± 7,48
VI	Perlakuan IV (Ekstrak <i>C. zedoria</i> 110 µg+ bFGF 60 ng)	42,00 ^a ± 10,98

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

Hasil penghitungan rerata ekspresi VEGF tertinggi didapatkan pada perlakuan nol pemberian bFGF 60 ng tanpa ekstrak (II) yaitu sebesar 137,00 ± 15,51 dan rerata tersebut tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan perlakuan ekstrak 60 µg (III), yaitu 123,00^d ± 13,63. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak 60 µg belum memberikan hasil yang baik untuk menghambat ekspresi VEGF. Ekspresi VEGF yang rendah didapatkan pada kelompok kontrol pelarut

(VI) yaitu $42,00^a \pm 10,98$ dan kelompok kontrol negatif (I) yaitu $57,25^{ab} \pm 4,34$, kedua kelompok perlakuan tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P > 0,5$). Kelompok perlakuan IV dan III memberikan hasil yang terbaik terhadap hambatan ekspresi VEGF, hasil tersebut berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan II, dan I. Pemberian ekstrak 90 μg merupakan yang terbaik dalam menurunkan ekspresi VEGF dan peningkatan hambatan VEGF.

BAB 5

PEMBAHASAN

BAB 5 PEMBAHASAN

Peran pemberian bFGF dalam menginduksi pembentukan pembuluh darah baru pada membrane korioalantois TAB, bisa dilihat pada hasil penelitian baik secara makroskopis maupun secara mikroskopis. Secara makroskopis terdapat pembentukan pembuluh darah baru di sekitar paper dish seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.1 pada bab IV. Hasil gambaran secara mikroskopis bisa dibuktikan dengan peningkatan ekspresi VEGF yang terlihat pada perlakuan nol (II). Kelompok kontrol negatif (tris-HCL + DMSO / perlakuan negative) memberikan respon angiogenesis yang rendah, sedangkan kelompok kontrol positif (bFGF 30 ng + Tris HCL / perlakuan nol) memberikan respon angiogenesis yang tinggi secara signifikan berbeda nyata ($p < 0,05$). Respon angiogenesis pada kelompok kontrol menunjukkan bahwa 30 ng bFGF efektif menginduksi angiogenesis. Hal ini tampaknya sesuai dengan hasil penelitian Janie dkk.(2006), tentang efek antiangiogenik ekstrak etanolik daun sambung nyawa (*Gynura procumbens*) pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam yang menyatakan pemberian bFGF dimaksudkan untuk menginduksi terjadinya angiogenesis, sebagaimana yang terjadi pada keadaan kanker, sehingga pengamatan efek antiangiogenesis ekstrak etanolik daun *Gynura procumbens* lebih jelas dan kemungkinan mekanismenya lebih terarah.

Kelompok kontrol negatif menggambarkan angiogenesis normal pada membran korioalantois telur ayam berembrio. Kelompok kontrol negatif dibandingkan dengan kelompok kontrol positif bertujuan untuk mengetahui

efektivitas bFGF menginduksi angiogenesis pada membran korioalantois telur ayam berembrio.

Berdasarkan hasil pengamatan mikroskopis terhadap ekspresi VEGF, tampak pada Gambar 4.2 bahwa 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.

Hasil pengamatan jumlah sel yang mengekspresikan VEGF menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap pemberian ekstrak rimpang *Curcuma zedoria*. Demikian pula terdapat hambatan ekspresi VEGF terutama pada pemberian ekstrak seiring dengan peningkatan dosis 75, 90 dan 110 μg .

Hal ini diperjelas dengan hasil penelitian dengan kelompok perlakuan VI dan I memberikan hasil yang terbaik dengan jumlah paling sedikit terhadap hambatan ekspresi VEGF, yang berbeda nyata ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan II, III dan IV. Hasil ekspresi VEGF secara keseluruhan dari setiap kelompok perlakuan menunjukkan bahwa dimulai dari pemberian ekstrak

Curcuma zedoria 60 µg, 75 µg 90 dan 110 µg telah terjadi penurunan ekspresi VEGF dibandingkan dengan kelompok perlakuan nol bFGF, kelompok kontrol positif ekstrak. Pemberian ekstrak 90 µg merupakan yang terbaik dalam menurunkan ekspresi VEGF dan peningkatan hambatan VEGF.

Pemberian ekstrak 90 µg (perlakuan III) yang terbaik karena rerata ekspresi VEGF berkurang, dan sangat berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif, tetapi tidak berbeda nyata dengan kontrol negative. Penurunan jumlah rerata ekspresi VEGF juga terdapat pada perlakuan IV dan berbeda nyata dengan perlakuan nol (positif) dan tidak berbeda nyata dengan kontrol negative, akan tetapi bukan merupakan pemberian dosis terbaik dan dimungkinkan terjadinya efek samping karena kelebihan dosis. Perlakuan III dengan dosis 90 µg berhasil menurunkan ekspresi VEGF sebesar 57%.

Hambatan ekspresi VEGF merupakan salah satu faktor yang menyebabkan hambatan pada pembentukan pembuluh darah baru. Hal tersebut sesuai pernyataan Kerbel *and* Folkman (2002) yang menyatakan bahwa hambatan terhadap salah satu faktor pertumbuhan seperti bFGF, VEGF dan TGF α secara langsung menghambat angiogenesis dan neovaskularisasi. Diduga bahwa apabila ada agen kimia yang mampu menghambat neovaskularisasi, maka agen kimia tersebut berpotensi besar dalam terapi pengobatan berbagai penyakit, termasuk kanker (Ribatti *et al.*, 1997).

Berbagai senyawa kimia yang terkandung didalam ekstrak rimpang kunyit putih diduga berperan sebagai anti angiogenesis pada membran korioalantois TAB. Zat kimia atau substansi antiangiogenesis yang dimiliki kunyit putih 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).

Ekstrak *Curcuma zedoaria* tampaknya berperan penting dalam hambatan angiogenesis melalui penurunan ekspresi VEGF, diduga ada kandungan dalam flavonoid yang berperan dalam menghambat beberapa faktor pertumbuhan angiogenesis maupun tumor.

Selain kurkumin, kandungan bahan aktif lainnya didalam kunyit putih, seperti minyak atsiri juga memiliki efek anti angiogenesis. Minyak atsiri anti angiogenesis bekerja dengan cara menghambat pembentukan cincin aorta dan menghambat pembentukan membran kapiler pada membran korioalantois telur ayam berembrio (Chen *et al.*, 2010).

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak rimpang kunyit putih mampu menghambat angiogenesis dengan cukup kuat, ditunjukkan penurunan rerata jumlah ekspresi VEGF pada setiap kelompok perlakuan dari perlakuan III, IV, V dan VI. Pemilihan dosis 90 µg menunjukkan hasil yang paling efektif dalam pemilihan dosis jika di bandingkan dengan ke tiga dosis perlakuan dalam penelitian ini.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang hambatan ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* oleh ekstrak rimpang *Curcuma zedoria* pada pembuluh darah membran korio alantois telur ayam berembrio, disimpulkan :

1. Ekstrak *Curcuma zedoria* 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.
2. Ekstrak *Curcuma zedoria* dapat menurunkan ekspresi VEGF. Ekspresi VEGF terendah dan hambatan ekspresi VEGF tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak *Curcuma zedoria* 90 µg.

6.2 Saran

Saran yang dapat diajukan setelah diperoleh hasil penelitian secara keseluruhan adalah sebagai berikut :

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengamatan terhadap beberapa variabel lain yang diduga berpengaruh terhadap mekanisme angiogenesis.

RINGKASAN

RINGKASAN

Angiogenesis adalah proses kompleks yang dimediasi oleh sel endotel yang melapisi pembuluh darah (Daniel dan Abrahamson, 2000). Angiogenesis mengacu pada proses pembentukan pembuluh darah baru. Ketika jaringan membutuhkan oksigen lebih banyak, sel tumor melepaskan molekul yang mendorong pertumbuhan pembuluh darah.

Proses angiogenesis sebagai indikator adanya perubahan status sel kanker dari benigna menjadi maligna. Perkembangan sel kanker terutama yang bersifat maligna menginduksi terbentuknya angiogenesis dengan mengaktivasi beberapa faktor pertumbuhan seperti VEGF, bFGF, PDGF, EGF dan TNF α (Papetti dan Herman, 2002).

Senyawa yang berpengaruh pada penghambatan karsinogenesis adalah kurkumin. Aktivitas anti kanker kurkumin dikaitkan dengan kemampuannya sebagai penghambat COX maupun pada jalur signaling sel, baik melalui pemacuan apoptosis maupun *cell cycle arrest* dengan mempengaruhi produk gen penekan tumor maupun *oncogene*. Kurkumin juga mempunyai khasiat sebagai antioksidan, penghambatan karsinogenesis, penghambatan proliferasi sel, anti estrogen, dan anti angiogenesis (Murwanti, 2004).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas ekstrak *Curcuma zedoria* sebagai anti angiogenesis dalam berbagai dosis melalui hambatan ekspresi VEGF pada sel endotel pembuluh darah membran korioalantois TAB. Penelitian tersebut dilakukan sebagai upaya mencegah pertumbuhan kanker, karena

angiogenesis merupakan salah satu penyebab terjadinya karsinogenesis. Penelitian ini menggunakan telur ayam berembrio (TAB) yang berumur 9 hari diinkubasi selama 72 jam yang terbagi dalam 6 kelompok perlakuan, terdiri dari kelompok I: merupakan kelompok control negative pelarut, kelompok II: merupakan kelompok perlakuan nol diinokulasi dengan bFGF 60 ng, kelompok III-VI: dalam setiap kelompok, merupakan perlakuan yang diberi ekstrak *Curcuma zedoria* sebesar 60, 75, 90 dan 110 µg + bFGF 60 ng. Semua bahan uji diinokulasikan pada TAB melalui media paper dish. Untuk mengamati ekspresi VEGF pada pembuluh darah membrane korioalantois dilakukan dengan metode imunohistokimia menggunakan antibody anti VEGF.

Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($p < 0.05$) pada pemberian ekstrak *Curcuma zedoria* terhadap ekspresi VEGF. Hasil hambatan VEGF yang nyata terdapat pada pemberian ekstrak *Gynura procumbens* dosis 75, 90 dan 110 µg. Kesimpulan hasil penelitian adalah bahwa ekstrak *Curcuma zedoria* mampu menghambat ekspresi VEGF pada pembentukan pembuluh darah baru membrane korioalantois TAB.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Anastasia.A.C. 2008. Skripsi Ekspresi CYP1A1 Dan GST μ Pada Tikus Sprague Dawley setelah Induksi 7,12 Dimetylbenz (a) antrasen (DMBA) dan pemberian ekstrak Temu Putih (*Curcuma zedoria*) Sebagai Anti Karsinogenesis).Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga; Surabaya
- Amin S.2010. perbedaan ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal tikus Sprague Dawley dengan dan tanpa pemberian ekstrak *Phyllanthus Niruri*.Universitas Diponegoro; Semarang.
- Anas, Y. 2010. Angiogenesis Inhibitor. Journal Angiogenesis pada kanker. Fakultas Farmasi universitas Gadjah Mada.
- Backer, and B. Van den Brink Jr, R.C. 1965. Flora of Java. 3 volumes. Noordhoff, Groningen, the Netherlands. Vol. 1 (1963) 647 pp., Vol. 2 641 pp., Vol. 3 (1968) 761 pp.
- Bergers, G., and D, Hanahan .2008. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 8: 592–603
- Bernard, W.I. 2000. "Disorders in Cell Circuitry During Multistage Carcinogenesis: The Role of Homeostasis." *Carcinogenesis* 21. 857-64.
- Burri, P.H., R. Hlushchuk, and V. Djonov, 2004. Intussusceptive angiogenesis: Its emergence, its characteristics, and its significance. *Developmental Dynamics*. Vol. 231. 474-488.
- Chen W, Lu Y, Gao M, Wu J, Wang A, Shi R. 2011. Curcumin (diferuloylmethane) down regulates cigarette smoke-induced NF- κ B activation through inhibition of I κ Ba kinase in human lung epithelial cells: correlation with suppression of COX-2, MMP-9 and cyclin D1. *J Ethnopharmacol*. Jan 7;133(1):220-6.
- Chen, T.R., D, Drabkowski., R.J, Hay., M, Macy., and Peterson,W., Jr. 1987. Widr is a derivate of another colon adenocarcinoma cell line. H T- 29. *Cancer Genet. Cytogenet*, 27: 125-134.

- Daniel T. O. and D. Abrahamson. 2000. Endothelial signal integration in vascular assembly. Center for Vascular Biology, Departments of Medicine and Cell Biology, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, Department of Cell Biology, University of Kansas Medical Center, Kansas City.
- Dewi, K.R. 2011. Skripsi: hambatan ekspresi Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) oleh ekstrak daun *Gynura procumbens* pada pembuluh darah membran korioalantois telur ayam berembrio. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga; Surabaya.
- Chrisnanto E., R. adelina, D. P. Dewi., A. Sahid, D. Styaningsih, R. I. Janie and E. Meiyanto. 2008. antiangiogenic effect of ethanol extract of *citrus reticulata* peel in the chorio allantoic membrane (cam) induced by bfgf. Faculty of pharmacy, Gadjah Mada University; Yogyakarta
- Farhat. 2009. Vascular Endothelial Growth Factor pada Karsinoma Nasofaring. Departemen Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok Bedah Kepala Leher Fakultas Kedokteran USU/RSUP H. Adam Malik Medan
- Folkman, J. 1998. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *the new England journal of medicine*. N Engl J Med 1971; 285:1182-1186.
- Griffits, E.J.F., Miller, D.T., Suzuki, R.D., Lewontin, W., and M. Gelbart. 1993. An Introduction to Genetic Analysis. 5th Ed. W.H. Preman and Company. New York. p. 841.
- 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
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A., 2000, The Hallmarks of Cancer, *Cell*, 100, 57-70.
- Hamid, I.S., Sugiyanto, E. Meiyanto dan S. Widayarni. 2008. Ekspresi Protein p53 pada kelenjar Mammae Tikus Galur Sprague dawley setelah inisiasi Dimethylbenz(a)antrasen (DMBA) dan Pemberian Kemopreventif *Gynura procumbens*. *J. Media Kedokteran Hewan*. 24 (3) 15-20.

- Jenie R.I, E. Meiyanto dan R. Murwanti. 2006. efek antiangiogenik ekstrak etanolik daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam. Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada; Yogyakarta
- Kerbel, R., and J. Folkman. 2002. clinical translation of angiogenesis inhibitors. nature reviews cancer volume 2: p 727-739.
- Kliche S, and Waltenberger J. 2001. VEGF receptor signaling and endothelial function. University Medical Center, Department of Internal Medicine II, Germany.
- Konerding et al. 2002. In Molls and Vaupel, eds. Blood Perfusion and Microenvironment of Human Tumors.
- Kumaran, G.C., G.C. Jayson, and A.R. Clamp. 2009. Antiangiogenic drugs in ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 100: 1–7.
- Mills S, and Bone K. 2000. Principles and practice of phytotherapy: Modern herbal medicine. *Philadelphia*: Churchill Livingstone.
- Muslichah, L. 2010. Makalah new discovery drug; Celasterol Sebagai Anti Angiogenesis.
- Murwanti, R., Meiyanto, E., Nurrochmad, A. and Kristina, SA. 2004. Efek Ekstrak Etanol Rimpang Temu Putih (*Curcuma zedoria* Rosc.) terhadap Pertumbuhan Tumor Paru Fase Post Inisiasi pada Mencit Betina Diinduksi Benzo(a)piren. *Majalah Farmasi Indonesia*, 15(1):7-12.
- Nafrialdi, G. 1995. Farmakologi dan terapi edisi IV. Fakultas Kedokteran Islam Indonesia, Jakarta
- Novalina. 2003. Penggunaan Tanaman Obat Sebagai Upaya Alternatif dalam Terapi Kanker. Pengantar ke Falsafah Sain. PPS Institut Pertanian Bogor.
- Nugroho, N. Aznam, dan Hajjah. 1998. Manfaat dan prospek pengembangan kunyit. Edisi I Trubus Agriwijaya, Ungaran.
- 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., Yang, H. T., dan Terjung, R. L. 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
- Ribatti, D., Gualandris, A., Bastaki, M., Vacca, A., Iurlaro, M., Roncali, L., 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.
- Ribatti, A. Vacca, L.R. dammacco. 2000. Chick embrio chorioalantoic membrane as a model for invivoresearch anti-angiogenesis. *Current pharmaceutical* vol.1 no.
- Ribatti, D., D. Leali., A. Vacca., R. Giuliani., A. Gualandris., L. Roncali., M.L. Nolli., and Presta, M.. 1999. In Vivo Angiogenic Activity of Urokinase; Role of Endogenous Fibroblast Growth Factor-2. *J. Cell. Sci.*, 112,
- Rifa'i M.,. 2009. Signal transduksi dan sistem pertahanan tubuh. Fakultas Matematika dan IlmuPpengetahuanAalam Universitas Brawijaya Malang.
- Rini, B.I. and E.J. Small. 2005. Interaction of VEGF ligands and VEGF receptors. *J. Clin Oncol.* 23: 1028-1043
- Robinson CJ, Stringer SE. 2004 The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci.* ;114:853– 65.
- Stegmann, T.J. 1998. A human growth factor in the induction of angiogenesis. *Exp.Opin.Invest.Drugs* 7: 2011-2015.
- Sugiyanto, B. Sudarto, E. Meiyanto, A.E. Nugroho dan U.A. Jenie. 2003. Aktivitas Antikarsinogenik Senyawa Yang Berasal Dari Tumbuhan. *J. Majalah Farmasi Indonesia.* 14(4): 216-225.
- Sugiyono. 2010. Metode penelitian kualitatif kuantitatif. Bandung: Alfabeta.

- Terman, B I. and Konstantin V. Stoletov. 2001. Biol. and Med. 18:59-66. VEGF and Tumor Angiogenesis. Departments of Medicine and Pathology Albert Einstein College of Medicine; Bronx, New York 10461
- Wati, W. K. 2011. Uji Aktivitas Ekstrak Daun Gynura Procumbens Sebagai Antiangiogenesis Pada Membran Korioalantois Telur Ayam Berembrio Yang Diinduksi Dengan Basic Fibroblast Growth Factor (Bfgf). (Abstr.): 1.
- 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.
- Windono, M. S., dan Parfiati, N, 2002, Curcuma zedoaria Rosc., Kajian Pustaka Kandungan Kimia dan Aktivitas Farmakologik, Artocarpus, 2(1): 1-10.

LAMPIRAN

LAMPIRAN

Lampiran 1. Penghitungan Dosis Ekstrak Etanol Daun *Gynura procumbens*.

Dosis antara 60 sampai 110 μg dari ekstrak daun *Gynura procumbens* (Wati, 2011), yang menjadi dasar digunakannya dosis 60 sampai 110 μg ekstrak kunyit putih yang digunakan dalam penelitian ini, ditentukan dengan menggunakan rumus:

$$F \sqrt[n]{I}$$

Keterangan : F = Faktor pengali, n = (jumlah dosis dalam rentang) – 1

$$I = \frac{\text{Dosis terbesar}}{\text{Dosis terkecil}}$$

Perhitungan dosis sebagai berikut:

$$F = \sqrt[4-1]{\frac{110}{60}} = \sqrt[3]{1,83} = \frac{1}{3} \times \log 1,83 = \frac{1}{3} \times 0,262$$

$$= 0,0873 \longrightarrow \text{anti log } 0,0873 = 1,22$$

$$\text{Dosis 1} = 60 \mu\text{g}$$

$$\text{Dosis 2} = 60 \mu\text{g} \times 1,22 = 73,2 \mu\text{g} \text{ dibulatkan menjadi } 75 \mu\text{g}$$

$$\text{Dosis 3} = 73,2 \mu\text{g} \times 1,22 = 89,30 \mu\text{g} \text{ dibulatkan menjadi } 90 \mu\text{g}$$

$$\text{Dosis 4} = 89,30 \mu\text{g} \times 1,22 = 108,9 \mu\text{g} \text{ dibulatkan menjadi } 110 \mu\text{g}$$

Lampiran 2. Hasil analisis statistik Ekspresi VEGF

NPAR TESTS

/K-S(NORMAL)=jumlah_ekspresi_VEGF

/STATISTICS DESCRIPTIVES

/MISSING ANALYSIS.

ONEWAY jumlah_ekspresi_VEGF BY kelompok_perlakuan

/STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY

/MISSING ANALYSIS

/POSTHOC=DUNCAN ALPHA(0.05).

Oneway**Notes**

Output Created		2012-07-09T14:40:06.827
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	24
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.

Syntax	ONEWAY jumlah_ekspresi_VEGF BY kelompok_perlakuan	
	/STATISTICS	DESCRIPTIVES
	HOMOGENEITY	
	/MISSING ANALYSIS	
	/POSTHOC=DUNCAN ALPHA(0.05).	
Resources	Processor Time	0:00:00.062
	Elapsed Time	0:00:00.094

[DataSet0]

jumlah ekspresi VEGF	Descriptives				
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval
					Lower Bound
Kontrol positif bFGF 30 ng	4	137.0000	15.51344	7.75672	112.3147
Kelompok kontrol negatif (placebo)	4	57.2500	4.34933	2.17466	50.3292
Ekstrak C zedoria 60 mikrogram + bFGF 30 ng	4	123.0000	13.63818	6.81909	101.2986
Ekstrak C zedoria 75 mikrogram + bFGF 30 ng	4	96.0000	7.78888	3.89444	83.6062
Ekstrak C zedoria 90 mikrogram + bFGF 30 ng	4	60.0000	7.48331	3.74166	48.0924
Ekstrak C zedoria 110 mikrogram + bFGF 30 ng	4	42.0000	10.98484	5.49242	24.5207
Total	24	85.8750	37.34832	7.62369	70.1042

Test of Homogeneity of Variances

jumlah ekspresi VEGF

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.734	5	18	.178

ANOVA

jumlah ekspresi VEGF

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	30033.875	5	6006.775	52.775	.000
Within Groups	2048.750	18	113.819		
Total	32082.625	23			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

jumlah ekspresi VEGF

Duncan

KELOMPOK PERLAKUAN	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Ekstrak C zedoria 110 mikrogram + bFGF 30 ng	4	42.0000			
Kelompok kontrol negatif (placebo)	4	57.2500	57.2500		
Ekstrak C zedoria 90 mikrogram + bFGF 30 ng	4		60.0000		
Ekstrak C zedoria 75 mikrogram + bFGF 30 ng	4			96.0000	
Ekstrak C zedoria 60 mikrogram + bFGF 30 ng	4				123.0000
Kontrol positif bFGF 30 ng	4				137.0000
Sig.		.058	.720	1.000	.080
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					

NPar Tests

Notes

Output Created	2012-07-09T14:37:05.180	
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	24
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each test are based on all cases with valid data for the variable(s) used in that test.
Syntax	NPAR TESTS /K-S(NORMAL)=jumlah_ekspresi_VEGF /STATISTICS DESCRIPTIVES /MISSING ANALYSIS.	
Resources	Processor Time	0:00:00.078
	Elapsed Time	0:00:00.078
	Number of Cases Allowed ^a	196608

a. Based on availability of workspace memory.

[DataSet0]

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
jumlah ekspresi VEGF	24	85.8750	37.34832	27.00	152.00

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		jumlah ekspresi VEGF
N		24
Normal Parameters ^a	Mean	85.8750
	Std. Deviation	37.34832
Most Extreme Differences	Absolute	.188
	Positive	.188
	Negative	-.105
Kolmogorov-Smirnov Z		.922
Asymp. Sig. (2-tailed)		.363
a. Test distribution is Normal.		