

Efek Antiangiogenik Ekstrak Etanol Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) pada Membran Korio Alantois (CAM) Embrio Ayam
(*The Antiangiogenic Effect of Ethanolic Extract of Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) on Chorio Allantoic Membrane of Chicken Embryos)

Roat Yeti Mustafida, Al Munawir, Rosita Dewi
Fakultas Kedokteran Universitas Jember
e-mail: roat.yeti@gmail.com

Abstract

Angiogenesis is the growth of new blood vessels that are used to supply nutrients and oxygen for cancer cells. *Phaleria macrocarpa* contains tannin, saponin, alkaloid, and flavonoid, that are known as an antiangiogenesis. This study determined the antiangiogenic effects of ethanolic extract of *Phaleria macrocarpa* on chorio allantoic membrane of chicken embryos. The antiangiogenesis trials used chorio allantoic membrane of 9 days chicken embryos. There were 5 groups, negative control group [K(-)] and 4 treatment groups (P), each group containing 4 eggs. K(-) group using aquadest and tween 80%; P groups with ethanolic extract of *Phaleria macrocarpa* at a concentration 10 ug/ μ L, 40 ug/ μ L, 80 ug/ μ L, 160 ug/ μ L for P1, P2, P3, dan P4 respectively. After 3 days incubation (12 days-old embryos), the eggs was opened and fixated, then observed by using stereo microscope (enlargement 50x) and then for calculating the growth of new blood vessels by using Image J software. The result showed that the ethanolic extract of *Phaleria macrocarpa* has an antiangiogenic effect by decreasing the number of new blood vessels on chorio allantoic membrane from the lowest dose to the highest dose, the negative control (42.5 ± 14.57), the concentrations 10 ug/ μ L (28.25 ± 3.59), 40 ug/ μ L (28.5 ± 1.73), 80 ug/ μ L (15 ± 4.32), 160 ug/ μ L (6.5 ± 1.73). In conclusions, the ethanolic extract of *phaleria macrocarpa* has an antiangiogenic effect on chorio allantoic membran.

Keywords: angiogenesis, *Phaleria macrocarpa*, ethanolic extract, chorio allantoic membrane

Abstrak

Angiogenesis adalah pertumbuhan pembuluh darah baru yang digunakan untuk memenuhi kebutuhan nutrisi dan oksigen sel-sel kanker. Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) mengandung tanin, saponin, alkaloid, dan flavonoid yang diduga sebagai senyawa antiangiogenesis. Penelitian ini bertujuan mengetahui efek antiangiogenik ekstrak etanol daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam. Uji antiangiogenesis menggunakan membran korio alantois (CAM) embrio ayam yang berumur 9 hari dengan 1 kelompok kontrol negatif [K(-)] dan 4 kelompok perlakuan (P), masing-masing kelompok menggunakan 4 telur. Kelompok K(-) menggunakan aquadest dan tween 80%; Kelompok P dengan pemberian ekstrak etanol buah mahkota dewa konsentrasi 10 μ g/ μ l, 40 μ g/ μ l, 80 μ g/ μ l, dan 160 μ g/ μ l berturut-turut untuk P1, P2, P3, dan P4. Setelah diinkubasi

3 hari (embrio berumur 12 hari), telur dibuka dan difiksasi, kemudian diamati secara makroskopis dengan mikroskop stereo (pembesaran 50x) untuk menghitung pertumbuhan jumlah pembuluh darah baru dengan bantuan software *Image J*. Data hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) memiliki efek antiangiogenik dengan menurunnya jumlah pertumbuhan pembuluh darah baru pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam sesuai dengan peningkatan dosis, dengan nilai ($X \pm SD$), kontrol negatif ($42,5 \pm 14,57$), konsentrasi 10 μ g/ μ l ($28,25 \pm 3,59$), 40 μ g/ μ l ($28,5 \pm 1,73$), 80 μ g/ μ l ($15 \pm 4,32$), 160 μ g/ μ l ($6,5 \pm 1,73$), sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daging buah mahkota dewa memiliki efek antiangiogenik pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam.

Pendahuluan

Kanker dengan ciri khas pertumbuhan sel yang tidak terkendali adalah salah satu masalah kesehatan yang serius karena menjadi penyebab kematian kedua setelah penyakit kardiovaskular. Menurut *Association Cancer Society* [1], “1,2 juta kasus kanker menyebabkan kematian” dan menurut *The Cancer Atlas*, kasus dan angka kematian akibat kanker akan terus meningkat. Diperkirakan 11 juta orang terdiagnosis kanker setiap tahunnya dan meningkat menjadi 16 juta orang pada tahun 2020 [1]. Sel-sel kanker memerlukan pasokan nutrisi melalui pembuluh darah untuk tumbuh dan berkembang sehingga sel-sel kanker mengeluarkan zat pertumbuhan untuk merangsang pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) untuk memenuhi suplai nutrisinya [2]. Buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) telah digunakan secara tradisional oleh masyarakat sebagai alternatif penatalaksanaan penyakit kanker, buah ini mengandung tanin, saponin, alkaloid, dan flavonoid yang diduga sebagai senyawa antiangiogenesis [3,4]. Penelitian ini bertujuan mengetahui efek antiangiogenik ekstrak etanol daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam. Uji antiangiogenesis secara *in vivo* menggunakan CAM (*Chorio Allantois Membrane*) embrio ayam karena vaskularisasi yang luas, mudah dilihat, mudah dijangkau, murah, masa eksperimen lebih pendek, dan diferensiasi pembuluh darah yang baik [5].

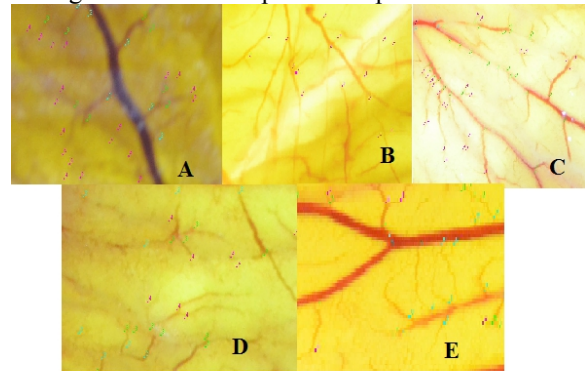
Metode Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian *true eksperimental design*, dilaksanakan di Laboratorium Biomolekular Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada bulan Agustus-Oktober 2013. Bahan yang digunakan adalah ekstrak etanol buah mahkota dewa. Pembuatan ekstrak etanol buah mahkota dewa dengan metode ekstraksi soxhletasi menggunakan pelarut etanol 96%. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah telur ayam kampung berembrio usia 1 hari yang diinkubasi selama 9 hari (216 jam) pada suhu 37°C sehingga umur telur berembrio 9 hari, kemudian dilakukan perlakuan dengan implantasi ekstrak etanol buah mahkota dewa. Kelompok perlakuan dibagi menjadi 5 kelompok, dan tiap kelompok terdiri atas 4 butir telur, kelompok K(-) dengan pemberian aquadest & tween 80 %, kelompok perlakuan (P) dengan pemberian ekstrak etanol buah mahkota dewa konsentrasi 10 µg/µl; 40 µg/µl; 80 µg/µl; dan 160 µg/µl berturut-turut untuk P1; P2; P3; dan P4. Setelah perlakuan selesai maka telur diinkubasi selama 3 hari (72 jam) sehingga

umur telur 12 hari, kemudian dibuka dan difiksasi untuk diamati secara makroskopis dengan mikroskop stereo perbesaran 50x dan software *image J*, kemudian dilakukan analisis data dengan *SPSS for windows 16*.

Hasil

Penghitungan jumlah pembuluh darah mengambil lapang pandang di bawah *paper disc* dengan software *Image J* dengan cara membagi tipe pembuluh darah berdasarkan percabangannya, tipe I adalah cabang terbesar dan terdekat dari pembuluh darah utama; tipe II adalah cabang dari tipe I; tipe III adalah cabang dari tipe II; dan tipe IV adalah cabang dari tipe III, tipe IV adalah cabang pembuluh darah terakhir atau cabang pembuluh darah baru yang digunakan sebagai penilaian pertumbuhan pembuluh darah baru. Hasil penghitungan pembuluh darah baru tipe IV dari masing-masing perlakuan dijumlahkan, kemudian dibagi untuk memperoleh rata-rata jumlah pembuluh darah baru tipe IV pada masing-masing konsentrasi. Hasil penghitungan jumlah pembuluh darah pada membran korio alantois dengan perlakuan ekstrak etanol daging buah mahkota dewa dengan berbagai konsentrasi dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. (A) K(-) dengan aquadest dan tween 80%; (B) ekstrak etanol buah mahkota dewa konsentrasi 10 µg/ml; (C) ekstrak etanol buah mahkota dewa konsentrasi 40 µg/ml; (D) ekstrak etanol buah mahkota dewa konsentrasi 80 µg/ml; (E) ekstrak etanol buah mahkota dewa konsentrasi 160 µg/ml (mikroskop stereo pembesaran 50x)

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Jumlah Pembuluh Darah Baru				X \pm SD
	I	II	III	IV	
160	8	5	8	5	6,5 \pm 1,73
80	15	17	9	19	15 \pm 4,32
40	31	27	28	28	28,5 \pm 1,73
10	33	29	26	25	28,25 \pm 3,59
Aquadest&tween 80%	64	34	39	33	42,5 \pm 14,57

Tabel 1. Hasil perhitungan jumlah pembuluh darah pada masing-masing kelompok perlakuan dengan berbagai konsentrasi

Berdasarkan data hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah pertumbuhan pembuluh darah baru pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam menurun sesuai dengan peningkatan dosis,

Hasil uji statistik *One Way Anova* menunjukkan data memiliki perbedaan signifikan dengan $p(0,00)$ sehingga $p<0,05$.

Pembahasan

Buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) telah digunakan secara tradisional oleh masyarakat sebagai alternatif pengobatan kanker, akan tetapi sampai saat ini belum diketahui secara pasti mekanisme antikanker terutama efek antiangiogeniknya. Penelitian ini bertujuan mengetahui efek antiangiogenik ekstrak etanol buah mahkota dewa secara *ex vivo* pada membran korio alantois embrio ayam.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) memiliki efek antiangiogenik secara signifikan. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya [4]. Penelitian ini tidak menggunakan *bFGF* seperti yang dilakukan ashadi dkk (2011) untuk merangsang pertumbuhan pembuluh darah baru.

Kandungan senyawa aktif mahkota dewa adalah tanin, saponin, alkaloid, dan flavonoid [6]. Tanin berperan sebagai antiproliferatif sel kanker yang bekerja pada tingkat sel dengan memblokir fase "S" dari siklus sel [7]. Saponin dapat menginduksi apoptosis dan menghambat proses angiogenesis [8], saponin dari *polygala senega* sebagai agen antiprolifatif pada *human vein endothelial cells* (HUVECs) dan dapat menghambat *vascular endothelial growth factor* (VEGF) yang berperan dalam pertumbuhan sel endotel untuk membentuk pembuluh darah [9], Alkaloid pada *Alchornea glandulosa* menghambat enzim *matrix metalloproteinase* (MMPs), mencegah degradasi matriks ekstraselular, menghambat proliferasi, dan

migrasi sel endotel sehingga mencegah neovaskularisasi sel tumor, semua penghambatan tersebut disebabkan oleh penghambatan pada VEGF karena VEGF menginduksi permeabilitas pembuluh darah, proliferasi sel endotel, migrasi sel endotel, dan perakitan pembuluh darah menjadi struktur kapiler [10], Flavonoid pada ekstrak buah berry menunjukkan penghambatan ekspresi VEGF [11]. Pada penelitian yang lain flavonoid juga menunjukkan penghambatan VEGF [12]. Senyawa flavonoid juga dapat menghambat proliferasi melalui inhibisi proses oksidatif yang dapat menyebabkan inisiasi kanker [13]. Flavonoid menghambat beberapa factor angiogenik, seperti proliferasi, migrasi sel endotelial dan pembentukan pipa pembuluh darah [14]. *Silymarin*, suatu flavonoid antioksidan, sedang dikembangkan sebagai agen inhibitor terhadap enzim COX-2 [15]. Masferrer *et al.* (2000) melaporkan bahwa angiogenesis diblok oleh inhibitor COX-2 yang diinduksi b-FGF. COX-2 berperan pada proses angiogenesis melalui sintesis prostaglandin (PG). PG berperan penting di dalam induksi VEGF, oleh karena itu penghambatan aktivitas COX-2 akan berakibat pada penghambatan angiogenesis [16]

Mekanisme penghambatan angiogenesis oleh ekstrak etanol buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) pada membran korio alantois (CAM) belum dapat dipastikan, diduga dengan cara menghambat *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Pada proses angiogenesis, VEGF bertujuan meningkatkan permeabilitas vaskular, meningkatkan proliferasi sel endotel, meningkatkan mitosis sel endotel, migrasi sel endotel, pembentukan lumen pembuluh darah baru, kemotaksis makrofag, dan vasodilatasi [17], sehingga ekstrak etanol daging buah mahkota dewa dapat menghambat proliferasi, mitosis, migrasi sel endotel dan perakitan lumen pembuluh darah menjadi sempurna oleh sel mural, serta menghambat pengeluaran *matrix metalloproteinase* (MMPs) oleh makrofag untuk degradasi matriks ekstraselular. Pembuluh darah pada membran korio alantois embrio ayam (CAM) berbeda dengan pembuluh darah pada kanker, pada kanker struktur anatomi mikroskopik pembuluh darahnya mudah rapuh dengan permeabilitasnya tinggi [17] sedangkan pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam pembuluh darahnya kuat dan permeabilitasnya normal. Walaupun demikian model angiogenesis pada membran korio alantois (CAM) paling baik digunakan karena secara teknik lebih mudah dan murah untuk sampel dalam jumlah besar pada screening bahan alam yang berpotensi sebagai antiangiogenik.

Walaupun demikian, penelitian ini belum bisa menjelaskan senyawa bioaktif mana dalam buah

mahkota dewa yang bersifat antiangiogenik. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap senyawa bioaktif spesifik yang terkandung dalam buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.).

Simpulan dan Saran

Kesimpulan penelitian ini, ekstrak etanol daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) memiliki efek antiangiogenik pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam sesuai dengan peningkatan dosis. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji zat aktif ekstrak etanol buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) yang berperan pada mekanisme penghambatan angiogenesis dan dosis efektif ekstrak etanol buah mahkota dewa untuk dikembangkan sebagai *new chemical entity* (NCE) sitostatika yang aman, murah, dan efek samping minimal.

Ucapan Terima Kasih

Terimakasih kepada almamater tercinta, Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Daftar Pustaka

- [1] Lisdawati Vivi. Kajian Terhadap Pengembangan Bahan Bioaktif Buah Mahkota Dewa sebagai Kandidat New Chemical Entity (NCE) untuk Pengobatan Kanker (sitostatika). Buletin Panel Kesehatan, 2009 Sept; 37(1): 23-32.
- [2] Frisca, Caroline, Sardjono, Sandra. Angiogenesis; Patofisiologi dan Aplikasi Klinis. JKM, 2009 Agst; 8 (2): 174-187.
- [3] Hendra, Ahmad, Oskueion, Sukari, Shukur. Antioxydant, Anti-Inflammatory and Cytotoxicity of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Fruit. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2011Sept; 11 (1): 10.
- [4] Ashadi, Tito, Wibowo. Efek Antiangiogenik Ekstrak Etanol Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) Pada Membran Korio Alantois (CAM) Embrio Ayam yang terinduksi bFGF. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Yogyakarta: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia. 2011.
- [5] Ribatti, Domenico. Review; The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as an In Vivo Assay to Study Angiogenesis. Pharmaceutical, 2010; 3: 482-513.
- [6] Lisdawati, Vivi. Buah Mahkota Dewa (*Phaleria Macrocarpa*): Toksisitas, Efek Antioksidan, dan

- Anti Kanker Berdasarkan Uji Penapisan Farmakologi. IPBrepprisatory [internet]. 2002 [cited 2013 Mei 21]; 1(6). Available from: [Http://Mahkotadewa.Com/VFC/Cici.Htm](http://Mahkotadewa.Com/VFC/Cici.Htm).
- [7] Kamei, Koide, Hashimoto, Kojima, Hasegawa. Tumor Cell Growth Suppression by Tannic Acid. Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 1999 Feb; 14(2): 135-138.
 - [8] Tong, Qing, Shu, He, Zhao, Li, Wang, Zhang, Xing, Xu, Wei, Huang, Wu. Deltonin, a Steroidal Saponin, Inhibits Colon Cancer Cell Growth *in Vitro* and Tumor Growth *in Vivo* via Induction of Apoptosis and Antiangiogenesis. Karger Medical and Scientific Publisher, 2011 Jan; 27: 3-4.
 - [9] Arai, Hayashi, Sobou, Ishida, Kawachi, Kotoku, Kobayashi. Anti-angiogenic effect of triterpenoidal saponins from *Polygala senega*. Journal of Natural Medicines, 2011 Jan; 1 (65): 149-156.
 - [10] Flavia, Rocha, Piracco, Regassini, Dulce, Silvia, Bolzani, Azevado, Carlos, Soares. Anti-angiogenic effects of pterogynidine alkaloid isolated from *Alchornea glandulosa*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2009 Sept; 9:15.
 - [11] Baghchi, Sen, Atalay. Anti-angiogenic, Antioxidant, and Anti-carcinogenic Properties of a Novel Anthocyanin-Rich Berry Extract Formula. Biochemistry (Moscow), 2011 Jan; 1 (69):75-80.
 - [12] Myoung, Kim. Flavonoids inhibit VEGF/bFGF-induced angiogenesis in vitro by inhibiting the matrix-degrading proteases. Wiley-Liss Inc, 2003 Okt; 10: 543.
 - [13] Ren, Qiao, Wang, Zhu, Zhang. 2003, Flavonoids: Promising Anticancer Agents, Medicinal Research Review, 2003 April; 23(4): 519-534.
 - [14] Igura, K., Ohta T., Kuroda Y., and Kaji K., 2001, Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro, Cancer Lett, 2001 Jan; 171 (1): 11-6.
 - [15] Tosetti, Ferrari, Flora, Albin. Angioprevention: angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents, FASEB J, 2002 Jan; 16:2-14.
 - [16] Masferrer, Leahy, Shergun. Antiangiogenic and Antitumor Activities of Cyclooxygenase-2 Inhibitors, Cancer Res, 2000 Jan; 60:1306-1311.
 - [17] Kisko, Brozzo, Missimer, Schleie, Menzel, Leppänen, Alitalo, Walzthoeni, Aebersold, Ballmer-Hofer. Structural analysis of vascular endothelial growth factor receptor-2/ligand complexes by small-angle X-ray solution scattering. Faseb J, 2011 Sept; 25 (9): 28806.