

Efek Antiangiogenik Ekstrak Polifenol Biji Kakao (*Theobroma cacao*) pada Membran Korio Alantois (CAM) Embrio Ayam (*Antiangiogenic Effect of Cocoa (Theobroma cacao) Polyphenol Extracts in Corio Alantois Membrane (CAM) Chicken Embryos*)

Mardhotillah Chilmy, Al Munawir, Misnawi
Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Jember (UNEJ)
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
E-mail: diahtamankampus@yahoo.com

Abstrak

Kanker adalah pertumbuhan sel abnormal yang cenderung menyerang jaringan di sekitarnya dan menyebar ke organ tubuh lain yang letaknya jauh. Salah satu strategi penghambatan perkembangan kanker adalah dengan menghambat proses angiogenesis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak polifenol kakao (*Theobroma cacao*) terhadap efek antiangiogenik pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam. Telur ayam berembrio umur 3 hari diberi perlakuan ekstrak polifenol *Theobroma cacao* kemudian diinkubasi selama 3 hari untuk selanjutnya diamati efek antiangiogeniknya. Berdasarkan penelitian yang dilakukan didapatkan hasil bahwa ekstrak polifenol *Theobroma cacao* mampu menghambat angiogenesis pada CAM. Dari 4 dosis yang diberikan, yaitu 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, dan 5 mg/ml didapatkan $p = 0,151$ ($p < 0,05$). Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak polifenol *Theobroma cacao* memiliki efek antiangiogenik.

Kata Kunci: antiangiogenik, kakao, embrio ayam, membran korio alantois, polifenol

Abstract

Cancer is the abnormal growth of cells that tend to invade surrounding tissue and spread to other far organs. Antiangiogenesis (inhibition of new blood vessels formation) has become a strategy to inhibit cancer development. The aim of the present research is to investigate antiangiogenesis effect in chorioallantoic membrane (CAM) of chick embryo. 3 days old fertilized chicken eggs were treated with extracts and observe antiangiogenic effect. The results showed that the ethanolic extract of *Theobroma cacao* could inhibit angiogenesis. 4 doses are given, ie 100 mg / ml, 50 mg / ml, 25 mg / ml, and 5 mg / ml obtained $p = 0.151$ ($p < 0.05$). These results demonstrate that *Theobroma cacao* polyphenol extracts have antiangiogenic effects.

Keywords: antiangiogenic, cocoa, chicken embryo, corio alantois membrane, polyphenol

Pendahuluan

Kanker merupakan salah satu penyakit tidak menular yang menjadi masalah kesehatan masyarakat, baik di dunia maupun di Indonesia. Di dunia, 12% seluruh kematian disebabkan oleh kanker dan pembunuh nomor 2 setelah penyakit kardiovaskular. Pada tahun 2005, WHO memperkirakan setiap tahun 12 juta orang di seluruh dunia menderita kanker dan 7,6 juta di antaranya meninggal dunia. Jika tidak dikendalikan, diperkirakan 26 juta orang akan menderita kanker dan 17 juta meninggal karena kanker pada tahun 2030 [1]. Untuk hidup semua sel memerlukan suplay darah yang adekuat untuk mendapatkan oksigen, makanan, serta membuang zat-zat sisa. Begitu pula sel kanker, kecepatan pertumbuhannya sangat dipengaruhi oleh suplay darah serta letaknya di dalam tubuh. Sekali sekelompok sel tumor mencapai ukuran tertentu dengan diameter sekitar 1 sampai 2 mm, maka suplay darah semula tidak akan mencukupi sehingga pembuluh-pembuluh darah baru harus dirangsang pertumbuhannya agar tumor tersebut dapat tumbuh lebih lanjut. Sebagian sel tumor mensekresikan

bahan kimia yang menyebabkan lingkungan lokal lebih kondusif bagi pertumbuhannya. Salah satunya adalah dengan mensekresi faktor angiogenesis tumor yang berfungsi merangsang pembentukan pembuluh darah baru. Eksperimen terakhir telah memperlihatkan bahwa tanpa angiogenesis, tumor segera menyusut dan terkadang menghilang [2]. Dalam penelitian sebelumnya telah dibuktikan bahwa Ekstrak etanolik daun sambung nyawa (*G.procumben*) menurunkan respon angiogenesis pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam. Dimana ekstrak etanolik daun sambung nyawa (*G.procumben*) mengandung berbagai senyawa kimia yang diduga mempunyai kemampuan menghambat angiogenesis, beberapa diantaranya adalah flavonoid dan polifenol [3]. Kakao (*Theobroma cacao*) merupakan salah satu jenis tanaman yang mengandung senyawa polifenol, yang dapat bertindak sebagai antioksidan yang bermanfaat bagi kesehatan manusia. Kandungan polifenol kakao lebih tinggi dibandingkan dari anggur, teh hitam, dan teh hijau. Kelompok senyawa polifenol yang banyak terdapat pada kakao adalah flavonoid golongan flavanol [4].

Metode Penelitian

Ekstrak polifenol biji kakao (*Theobroma cacao*) konsentrasi 1500 mg/ml diperoleh di Puslit Kopi dan Kakao Indonesia, yaitu hasil pengestraksian 7.000 gram biji kakao bebas lemak menggunakan teknik maserasi etanol 90%.

Pengujian terhadap aktivitas antiangiogenesis dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut : telur ayam kampung berembrio yang dipakai berumur 1 hari kemudian diinkubasi sampai umur telur 3 hari. Ekstrak polifenol kakao diimplantasi ke dalam membran korio alantois melalui lubang pada ruang udara. Telur dibagi kedalam 6 kelompok. Kelompok A adalah kelompok kontrol aquades + tween 80%. Kelompok B adalah kelompok kontrol tanpa perlakuan. Sedangkan kelompok 1, 2, 3, 4 merupakan kelompok telur yang digunakan untuk melihat efek penghambatan ekstrak polifenol biji kakao terhadap angiogenesis CAM (*corio alantois membrane*). Setelah diberi perlakuan, kemudian telur diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 hari. Setelah itu CAM difoto menggunakan kamera kemudian diamati secara makroskopik [3].

Pembentukan pembuluh darah baru yang dihitung adalah cabang terkecil terakhir baik yang muncul dari pembuluh darah utama maupun dari cabang pembuluh darah ke 2 dan ke 3. Pembuluh darah utama adalah pembuluh darah yang paling besar dan keluar dari embrio. Analisis data yang digunakan adalah uji *Kolmogorov-Smirnov*, uji ini bertujuan untuk mengetahui apakah data yang diperoleh terdistribusi normal. Selanjutnya, dilakukan uji homogenitas Levene untuk mengetahui apakah varians data homogen atau tidak. Apabila variansi data homogen, maka dilakukan analisis variansi satu arah (*One Way ANOVA*), bila varians data tidak homogen maka analisis data dilakukan dengan alternatif lainnya yaitu uji *Kruskal-Wallis*, untuk mengetahui apakah kelompok data berbeda secara bermakna. Kemudian untuk mengetahui kelompok mana yang mempunyai perbedaan dan tidak dilakukan uji *Post Hoc multiple comparisons*. Untuk mengetahui hubungan peningkatan konsentrasi dengan pembentukan pembuluh darah baru secara kuantitatif dilakukan uji Regresi Linier.

Hasil Penelitian

Rata-rata jumlah pembuluh darah baru terbesar ada pada membran korio alantois yang tidak diberi perlakuan dan rata-rata jumlah pembuluh darah baru terkecil ada pada membran korio alantois yang diberi ekstrak polifenol dengan konsentrasi 50 mg/ml. Dari hasil uji *Kolmogorov-Smirnov* didapatkan $p=0,709$. Oleh karena $p > \alpha$ dan $\alpha=0,05$ maka dapat dikatakan bahwa data tersebut memiliki distribusi normal. Karena salah satu syarat untuk melakukan uji *One Way Anova* terpenuhi, analisis data dilanjutkan dengan uji homogenitas. Dari hasil uji homogenitas didapatkan $p=0,151$ menunjukkan data tersebut homogen karena $p > \alpha$, $\alpha = 0,05$. Kemudian dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* dan didapatkan $p=0,002$. Oleh karena $p < \alpha$ dan $\alpha=0,05$ maka dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat perbedaan jumlah pembuluh darah baru yang signifikan antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol tanpa

perlakuan.

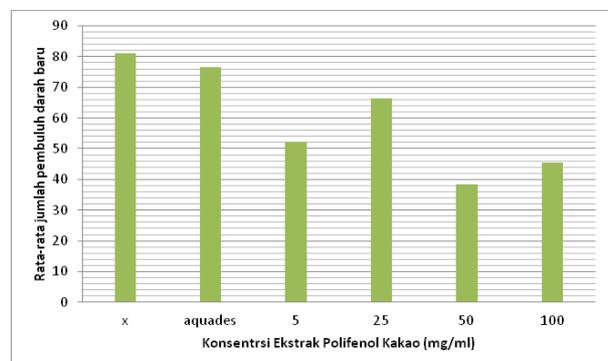
Untuk mengetahui kelompok mana yang mempunyai perbedaan signifikan maka dilakukan analisis *Post Hoc* dengan uji *LSD*. Dari uji *LSD* didapatkan hasil jumlah pembuluh darah baru pada pemberian aquades memiliki perbedaan yang signifikan dengan konsentrasi 50 mg/ml, 100 mg/ml, dan 5 mg/ml. Sedangkan jumlah pembuluh darah baru pada membran yang tidak diberi perlakuan memiliki perbedaan yang signifikan dengan konsentrasi 50 mg/ml, 100 mg/ml, dan 5 mg/ml. Jumlah pembuluh darah baru pada membran yang diberi ekstrak konsentrasi 5 mg/ml memiliki perbedaan yang signifikan dengan aquades dan membran yang tidak diberi perlakuan. Jumlah pembuluh darah baru pada membran yang diberi ekstrak konsentrasi 25 mg/ml memiliki perbedaan yang signifikan dengan konsentrasi 50 mg/ml. Jumlah pembuluh darah baru pada membran yang diberi ekstrak konsentrasi 50 mg/ml memiliki perbedaan yang signifikan dengan aquades, tanpa perlakuan dan konsentrasi 25 mg/ml. Jumlah pembuluh darah baru pada membran yang diberi ekstrak konsentrasi 100 mg/ml memiliki perbedaan yang signifikan dengan aquades dan tanpa perlakuan.

Uji regresi linier dilakukan untuk menentukan pengaruh peningkatan konsentrasi ekstrak polifenol kakao terhadap penurunan jumlah pembuluh darah baru secara kuantitatif, didapatkan nilai $p = 0,507$. Oleh karena nilai p lebih dari 0,05, maka dikatakan nilai tersebut tidak signifikan. Tidak signifikan berarti tidak ada pengaruh antara kenaikan dosis ekstrak terhadap variabel terikat (pembentukan pembuluh darah baru).

Bentuk umum garis regresi dinyatakan dengan $Y = bX + a$. Y adalah variabel terikat dan X adalah variabel bebas. Berdasarkan uji regresi linier didapatkan nilai $a = 57,148$ dan $b = -0,144$ sehingga persamaan garis regresi menjadi:

$$Y = -0,144X + 57,148$$

Untuk menentukan pengaruh kenaikan konsentrasi ekstrak terhadap jumlah pembuluh darah baru secara kuantitatif, dimisalkan nilai $Y = 1$ akan didapatkan nilai X sebesar 403,805. Pernyataan tersebut memiliki arti bahwa pada konsentrasi 403,805 mg/ml akan menimbulkan pembentukan pembuluh darah minimal yaitu 1.



Gambar 4.7 Diagram batang hubungan antara konsentrasi ekstrak polifenol biji kakao dengan rata-rata jumlah pembuluh darah baru

Pembahasan

Berdasarkan uji statistika yang telah diuraikan di atas ekstrak polifenol kakao (*Theobroma cacao*) memiliki efek antiangiogenik. Ekstrak ini menghambat angiogenesis secara direk, dimana penghambatan terjadi pada proses yang menyebabkan migrasi dan proliferasi endotel. Penyebab migrasi dan proliferasi endotel yang utama adalah enzim pendegradasi protein yang dikeluarkan oleh endotel saat endotel teraktivasi, yaitu enzim Matrix methalloproteinase (MMP). Dimana pada prosesnya tahap awal perangsangan pembentukan pembuluh darah baru pada kanker dimulai dari difusi faktor pertumbuhan pembuluh darah yang dikeluarkan kanker menuju reseptor yang ada di permukaan sel endotel. Setelah mencapai sel endotel dan berikatan dengan reseptornya, faktor pertumbuhan pembuluh darah tersebut akan menyebabkan endotel teraktivasi. Teraktivasinya endotel menyebabkan pembengkakan serta peningkatan permeabilitas vaskuler. Peningkatan permeabilitas vaskuler menyebabkan ekstravasasi plasma darah ke luar lumen pembuluh darah. Selain pembengkakan sel endotel dan peningkatan permeabilitas kapiler, aktivasi endotel menyebabkan endotel mengeluarkan suatu zat pendegradasi protein, yaitu enzim MMP. Enzim MMP yang bekerja pada proses angiogenesis adalah enzim MMP-2 dan MMP-9, ke-2 enzim ini secara spesifik berfungsi untuk mendegradasi kolagen tipe IV, laminin-5, membantu sel-sel kanker bermetastase, juga menyebabkan peningkatan pertumbuhan tumor dengan membentuk ruangan yang penting. Rasio peningkatan matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) dari bentuk aktif ke laten berhubungan dengan progresi tumor pada kanker-kanker invasive. Begitu enzim MMP dikeluarkan oleh sel endotel sasaran pertama adalah membran basalis, dan ketika membran basalis telah terdegradasi endotel-endotel akan lepas dan bermigrasi ke arah membrane yang terdegradasi tersebut. Awalnya endotel akan berkumpul lalu berproliferasi di tempat tersebut, lama kelamaan akan tersusun prekursor-prekursor pembuluh darah yang lain yaitu membran basalis serta otot polos. Penghambatan ekstrak kakao terjadi pada penetralisan enzim MMP sehingga tidak terjadi degradasi membran basal, endotel tidak dapat bermigrasi dan berproliferasi, dan loop pembuluh darah baru tidak akan terbentuk. Sedangkan pada proses penghambatan angiogenesis secara tidak langsung penghambatan tidak terjadi pada enzim MMP melainkan pada faktor-faktor pertumbuhan pembuluh darah yang dikeluarkan oleh sel kanker.

Kenaikan dosis ekstrak polifenol kaka (*Theobroma cacao*) tidak mengalami signifikansi pada berkurangnya pembentukan pembuluh darah baru dimungkinkan karena rentang dosis yang digunakan kurang jauh. Hal ini diketahui dari perkiraan yang didapatkan dari uji statistika menggunakan regresi linier, dimana untuk mendapatkan perbedaan 10 pembentukan pembuluh darah baru diperlukan dosis ekstrak 327 mg/ml. perkiraan ini didapatkan dari rumus uji regresi linier $Y = -0,144X + 57,148$ dimana Y adalah pembentukan pembuluh darah baru dan X adalah ekstrak polifenol kakao (*Theobroma cacao*).

Kesimpulan dan Saran

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak polifenol kakao (*Theobroma cacao*) memiliki efek antiangiogenik pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam. Peningkatan dosis pemberian ekstrak polifenol kakao (*Theobroma cacao*) tidak memiliki perubahan efek antiangiogenik yang cukup bermakna pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap manfaat kakao sebagai antiangiogenik. Perlu dilakukan penelitian tentang proses penghambatan pembentukan pembuluh darah menggunakan kakao secara spesifik.

Daftar Pustaka

- [1] Riskesdas, 2007. Jika Tidak Dikendalikan 26 Juta Orang di Dunia Menderita Kanker. <http://depkes.go.id/index.php/berita/press-release/1060-jika-tidak-dikendalikan-26-juta-orang-di-dunia-menderita-kanker-.html>.
- [2] Corwin, E. J. 2007. *Buku Saku Patofisiologi*. Cetakan I. Jakarta: EGC.
- [3] Jenie, R.I., Meiyanto, E., dan Muwanti, R. 2006. Efek Antiangiogenik Ekstrak Etanolik Daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) pada Membran Korio Alantois (CAM) Embrio Ayam. *Majalah Farmasi Indonesia*. Vol 17(1): 50-55.
- [4] Paembong, A. 2012. "Mempelajari Perubahan Kandungan Polifenol Biji kakao (*Theobroma Cacao L*) dari Hasil Fermentasi yang Diberi Perlakuan Larutan Kapur." Tidak Diterbitkan. Skripsi. Makassar : Fakultas Pertanian Universitas Hasanuddin.