



**EFEK ANTIANGIOGENIK EKSTRAK POLIFENOL BIJI
KAKAO (*THEOBROMA CACAO*) PADA MEMBRAN KORIO
ALANTOIS (CAM) EMBRIO AYAM**

SKRIPSI

Oleh

Mardhotillah Chilmy

NIM 092010101037

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2012**



**EFEK ANTIANGIOGENIK EKSTRAK POLIFENOL BIJI
KAKAO (*THEOBROMA CACAO*) PADA MEMBRAN KORIO
ALANTOIS (CAM) EMBRIO AYAM**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

Mardhotillah Chilmy

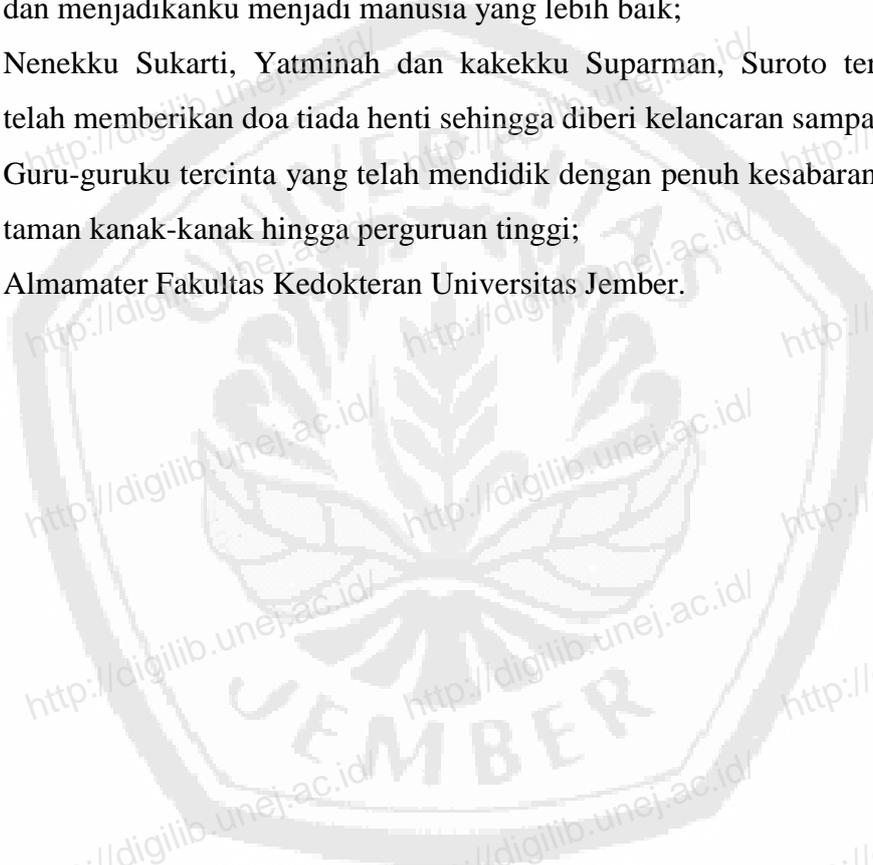
NIM 092010101037

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2012**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Orang tuaku tercinta, bapak Edy Subroto dan mama Ismiati yang senantiasa memberikan doa dan kasih sayangnya tiada henti, serta yang telah mendidik dan menjadikanku menjadi manusia yang lebih baik;
2. Nenekku Sukarti, Yatminah dan kakekku Suparman, Suroto tercinta yang telah memberikan doa tiada henti sehingga diberi kelancaran sampai saat ini;
3. Guru-guruku tercinta yang telah mendidik dengan penuh kesabaran mulai dari taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.



MOTO

Hai sekalian manusia, makanlah yang halal lagi baik dari apa yang terdapat di bumi, dan janganlah kamu mengikuti langkah-langkah syaitan; karena sesungguhnya syaitan itu adalah musuh yang nyata bagimu.

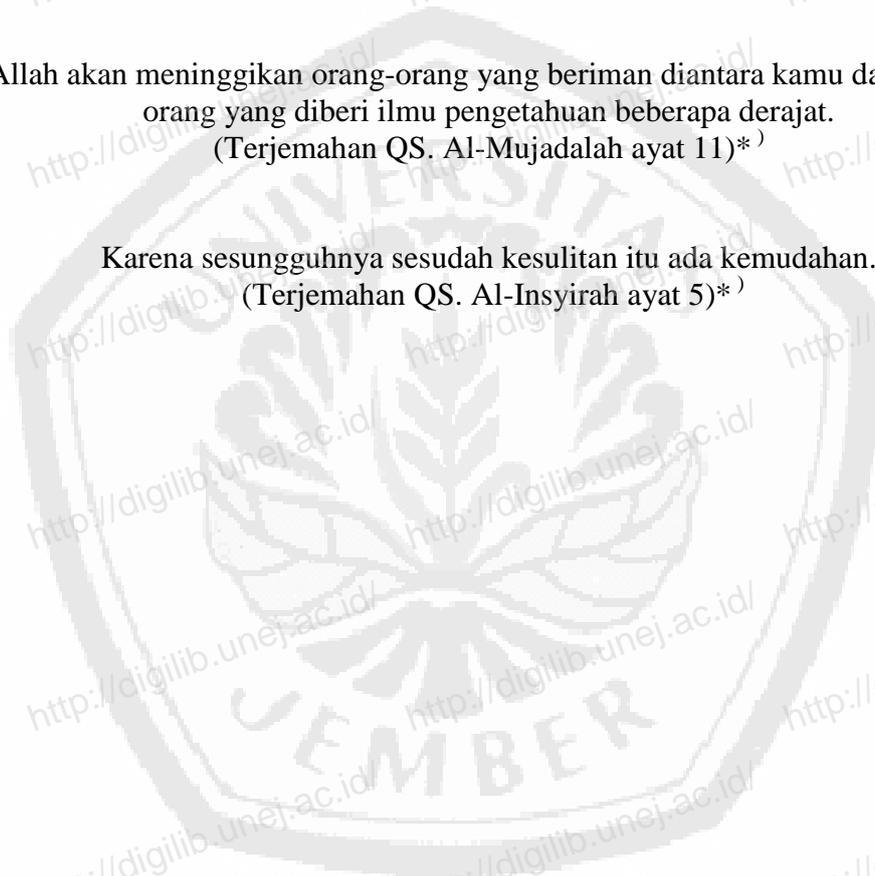
(Terjemahan QS. Al-Baqarah ayat 168)*)

Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman diantara kamu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat.

(Terjemahan QS. Al-Mujadalah ayat 11)*)

Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan.

(Terjemahan QS. Al-Insyirah ayat 5)*)



*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2005. *Al-Qur'an Al-Karim dan Terjemah Makna ke Dalam Bahasa Indonesia*. Kudus: Menara Kudus.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Mardhotillah Chilmy

NIM : 092010101037

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul *Efek Antiangiogenik Ekstrak Polifenol Biji Kakao (Theobroma Cacao) pada Membran Korio Alantois (Cam) Embrio Ayam* adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 6 November 2012

Yang menyatakan,

Mardhotillah Chilmy

NIM 092010101037

SKRIPSI

**EFEK ANTIANGIOGENIK EKSTRAK POLIFENOL BIJI
KAKAO (*THEOBROMA CACAO*) PADA MEMBRAN KORIO
ALANTOIS (CAM) EMBRIO AYAM**

Oleh

Mardhotillah Chilmy

NIM 092010101037

Pembimbing

Dosen Pembimbing I: dr. Al Munawir, M.Kes., Ph.D

Dosen Pembimbing II: Dr. Ir. Misnawi

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efek Antiangiogenik Ekstrak Polifenol Biji Kakao (*Theobroma Cacao*) Pada Membran Korio Alantois (Cam) Embrio Ayam” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Selasa, 6 November 2012

tempat : Fakultas Kedokteran Umum Universitas Jember

Tim Penguji:

Penguji I

Penguji II

dr. Dina Helianti, M. Kes
NIP 197411042000122001

dr. M. Ihwan Narwanto, M. Sc
NIP 198002182005011001

Penguji III

Penguji IV

dr. Sugiyanta, M. Ked
NIP 197902072005011001

dr. Hairrudin, M. Kes
NIP 197510112003121001

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember

dr. Enny Suswati, M. Kes
NIP 19700214 199903 2 001

RINGKASAN

Efek Antiangiogenik Ekstrak Polifenol Biji Kakao (*Theobroma Cacao*) Pada Membran Korio Alantois (Cam) Embrio Ayam; Mardhotillah Chilmy; 092010101037; 2009; 50 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

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. Ironisnya, kejadian ini akan terjadi lebih cepat di negara miskin dan berkembang. 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

Tujuan umum dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh ekstrak polifenol *Theobroma cacao* terhadap efek antiangiogenik pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam. Penelitian ini adalah penelitian true eksperimental, dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Jember pada bulan Oktober 2012. Bahan yang digunakan adalah ekstrak polifenol biji kakao. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah telur ayam kampung berembrio usia 1 hari yang sudah dibagi menjadi 6 kelompok, dan tiap kelompok terdiri 4 butir

telur yaitu K(tanpa perlakuan), aquades, P1 yaitu ekstrak 100 mg/ml, P2 yaitu ekstrak 50 mg/ml, P3 yaitu ekstrak 25 mg/ml, dan P4 yaitu ekstrak 5 mg/ml.

Ekstrak polifenol kakao (*Theobroma cacao*) diimplantasikan ke dalam membran korio alantois embrio ayam yang berusia 1 hari yang telah diinkubasi selama 3 hari, setelah perlakuan telur ayam diletakkan lagi di dalam inkubator selama 3 hari. Setelah 3 hari membran korio alantois difiksasi dengan methanol + aseton 1:1 selama 10 menit di lemari pendingin kemudian dikeringkan. Setelah kering membrane difoto dan dihitung jumlah pembuluh darah baru yang muncul.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak polifenol *Theobroma cacao* memiliki daya antiangiogenik terhadap membran korio alantois. Hasil analisis data menggunakan *One Way ANOVA* diperoleh hasil $p = 0,002$ dan $\alpha = 0,05$. Dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat perbedaan jumlah pembuluh darah baru yang signifikan antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol tanpa perlakuan. Pada pengolahan data dengan menggunakan uji regresi linier tidak ada pengaruh yang signifikan antara kenaikan dosis ekstrak terhadap variabel terikat (pembentukan pembuluh darah baru).

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Antiangiogenik Ekstrak Polifenol Biji Kakao (*Theobroma Cacao*) Pada Membran Korio Alantois (Cam) Embrio Ayam”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M.Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. dr. Al Munawir, M.Kes., Ph.D selaku Dosen Pembimbing I dan Dr. Ir. Misnawi selaku Dosen Pembimbing II yang telah banyak membantu dan meluangkan waktu, pikiran serta perhatiannya untuk membimbing penulisan skripsi ini sejak awal hingga akhir;
3. dr. Wiwien Sugih Utami, M.Kes, Selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama studi;
4. dr. Heni Fatmawati, M.Kes dan dr. Sugiyanta, M.Ked, selaku koordinator KTI yang telah menyetujui penyusunan skripsi ini;
5. dr. Dina Helianti, M.Kes, dr. M. Ihwan Narwanto, M.Sc, dr. Sugiyanta, M.Ked, dr. Hairrudin, M.Kes sebagai dosen penguji yang banyak memberikan kritik, saran, dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
6. Ayahanda Edy Subroto dan ibunda Ismiati tercinta atas dukungan moril, materi, doa, dan semua curahan kasih sayang yang tak akan pernah putus. Kebahagiaan kalian adalah segalanya untukku;
7. Adikku Jemyma, Vero, Jack, Meka, Meta yang selalu ceria dan memberiku motivasi untuk menyelesaikan tugas akhir ini;
5. Sahabat-sahabat Yulya, Emi, Iyink, Dila, Ayu, Rima, Intan yang telah memberikan semangat dan motivasi;

8. Rekan satu timku Risma Adista terimakasih atas dukungan dan nasehat-nasehatnya;
9. Teman-teman angkatan 2009 yang selalu saling support dan menjadi teman seperjuangan demi mendapatkan gelar sarjana kedokteran;
10. Teman-teman angkatan lain yang telah hadir di seminar proposal dan atas dukungannya;
11. Teknisi Puslit Kakao mas Panji dan mbak Fitratin terimakasih sudah memberi pengalaman baru dan atas bantuannya selama penelitian;
12. Semua pihak yang telah memberikan bantuan dan dukungan dalam penyusunan karya tulis ilmiah ini, yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga karya tulis ini bermanfaat bagi pembaca dan khususnya untuk perkembangan Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Jember, 6 November 2012

Penulis

DAFTAR ISI

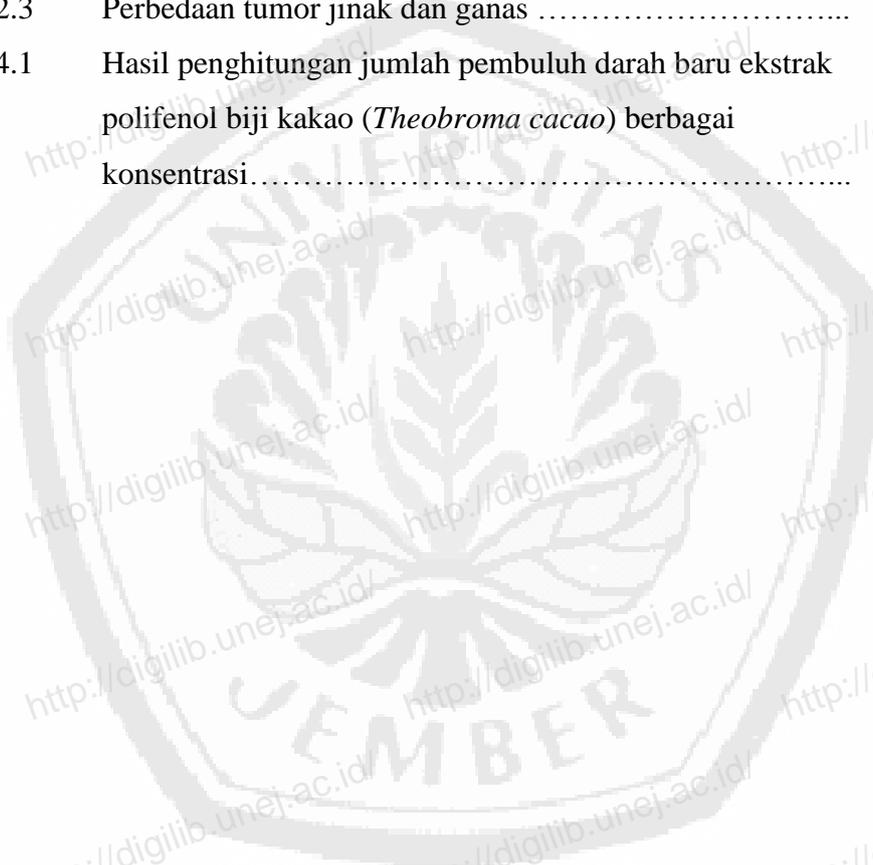
	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN BIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tanaman Kakao	5
2.2 Polifenol Kakao	7
2.2.1 Katekin.....	9
2.2.2 Leukosianidin.....	9
2.2.3 Antosianin.....	9

2.3 Tumor	10
2.3.1 Definisi Tumor	10
2.3.2 Klasifikasi	10
2.4 Kanker	11
2.4.1 Proliferasi Sel	12
2.4.2 Apoptosis	13
2.4.2 Angiogenesis	13
2.5 Angiogenesis Pada Tumor.....	14
2.6 Matriks Metalloproteinase.....	16
2.7 Metode Ekstraksi	18
2.8 Antiangiogenik	18
2.9 Membran Korio Allantois Telur Ayam Berembrio.....	19
2.10.1 Perkembangan Embrio Unggas dari Hari ke Hari	19
2.10 Kerangka Konseptual Penelitian.....	23
2.11 Hipotesis Penelitian.....	25
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	26
3.1 Jenis Penelitian.....	26
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	26
3.3 Sampel Penelitian.....	26
3.3.1 Sampel Penelitian	26
3.3.2 Jumlah Sampel.....	26
3.4 Rancangan Penelitian	27
3.5 Variabel Penelitian.....	28
3.5.1 Variabel Bebas	28
3.5.2 Variabel Terkendali	28
3.6 Definisi Operasional.....	29
3.7 Alat dan Bahan.....	29
3.7.1 Alat.....	29
3.7.2 Bahan	29
3.8 Prosedur Penelitian.....	29
3.8.1 Pembuatan Ekstrak Polifenol Biji Kakao	29

3.8.2 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Polifenol Biji Kakao	32
3.8.3 Tahap perlakuan Terhadap Media Telur Ayam.....	32
3.8.4 Tahap Pengamatan.....	33
3.9 Analisis Data.....	33
3.10 Alur Penelitian	34
3.10.1 Pengenceran	34
3.10.2 Alur Penelitian	35
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	36
4.1 Hasil Penelitian.....	36
4.2 Analisis Data.....	40
4.3 Pembahasan.....	42
BAB 5. PENUTUP.....	46
5.1 Kesimpulan.....	46
5.2 Saran	46
DAFTAR PUSTAKA.....	47
LAMPIRAN.....	50

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1	Klasifikasi ilmiah kakao..... 5
2.2	Presentase kandungan polifenol kakao Foraster 8
2.3	Perbedaan tumor jinak dan ganas 11
4.1	Hasil penghitungan jumlah pembuluh darah baru ekstrak polifenol biji kakao (<i>Theobroma cacao</i>) berbagai konsentrasi..... 39

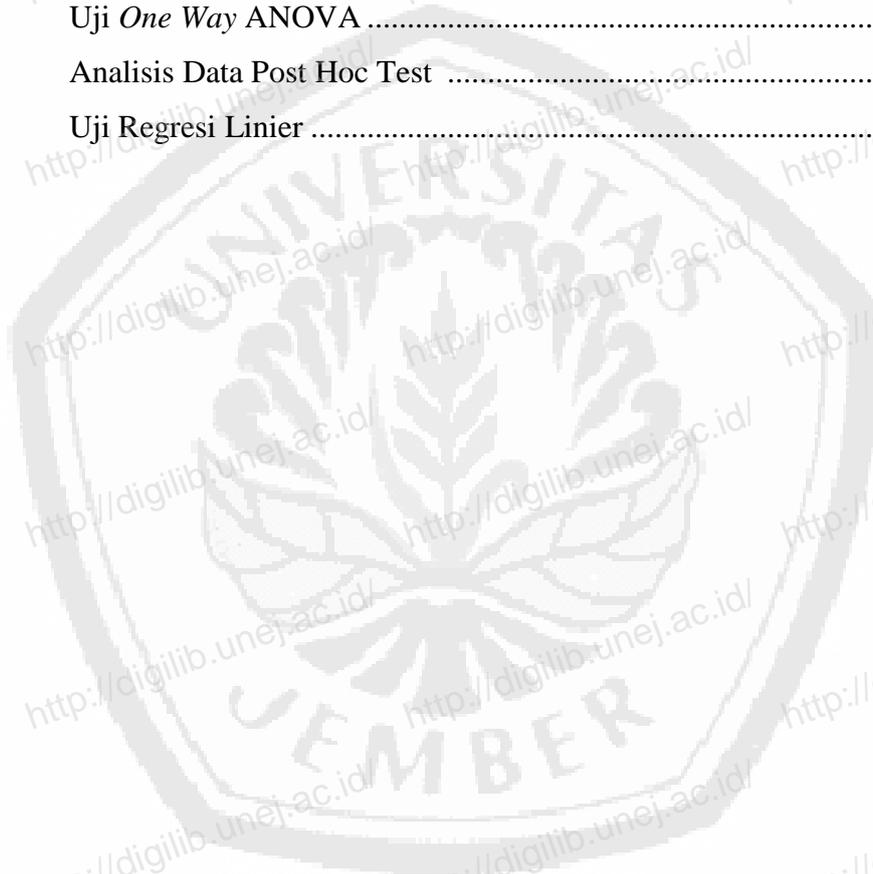


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur katekin.....	9
2.2 Struktur Leukoantosianin.....	9
2.3 Struktur antosianin.....	10
2.4 Mekanisme angiogenesis.....	14
2.5 Embrio Ayam.....	20
2.6 Skema kerangka konseptual penelitian.....	23
3.1 Skema rancangan penelitian.....	27
3.2 Skema pembuatan ekstrak polifenol biji kakao.....	32
3.3 Skema pengenceran ekstrak.....	34
3.4 Skema alur penelitian.....	35
4.1 Membran korio alantois tanpa diberi perlakuan.....	36
4.2 Membran korio alantois dengan pemberian aquades + tween 80%.....	37
4.3 Membran korio alantois dengan pemberian ekstrak polifenol kakao konsentrasi 5 mg/ml.....	37
4.4 Membran korio alantois dengan pemberian ekstrak polifenol kakao konsentrasi 25 mg/ml.....	38
4.5 Membran korio alantois dengan pemberian ekstrak polifenol kakao konsentrasi 50 mg/ml.....	38
4.6 Membran korio alantois dengan pemberian ekstrak polifenol kakao konsentrasi 100 mg/ml.....	30
4.7 Diagram batang hubungan antara konsentrasi ekstrak polifenol biji kakao dengan rata-rata jumlah pembuluh darah baru.....	40

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Uji Normalitas Data	50
B. Uji Homogenitas	50
C. Uji <i>One Way</i> ANOVA	51
D. Analisis Data Post Hoc Test	53
E. Uji Regresi Linier	56



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

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. Ironisnya, kejadian ini akan terjadi lebih cepat di negara miskin dan berkembang (International Union Against Cancer /UICC, 2009). Menurut Prof. Tjandra Yoga, di Indonesia prevalensi kanker adalah 4,3 per 1000 penduduk dan merupakan penyebab kematian nomor 7 (5,7%) setelah stroke, TB, hipertensi, cedera, perinatal, dan DM (Riskesmas, 2007).

Kanker adalah pertumbuhan sel abnormal yang cenderung menyerang jaringan di sekitarnya dan menyebar ke organ tubuh lain yang letaknya jauh. Kanker sering dikenal oleh masyarakat sebagai tumor, padahal tidak semua tumor adalah kanker. Tumor adalah segala benjolan tidak normal atau abnormal. Tumor dibagi dalam 2 golongan, yaitu tumor jinak dan tumor ganas. Kanker adalah istilah umum untuk semua jenis tumor ganas (YKI, 2012). Kanker terjadi karena proliferasi sel tak terkontrol yang terjadi tanpa batas dan tanpa tujuan bagi pejamu. Meskipun setiap kanker memiliki ciri unik, kanker muncul melalui beberapa proses yang sama dan pada akhirnya bergantung pada perubahan genetik secara krusial. Perubahan tersebut mendorong pertumbuhan sel, menginaktivasi gen yang normalnya tumbuh lambat, membiarkan sel tetap membelah sehingga sel bersifat immortal (tidak mati), dan membiarkan sel tetap berada dalam kondisi abnormal yang dalam kondisi lain menyebabkan kematian sel atau apoptosis. Selain itu sel kanker dapat merekrut sel normal untuk menunjang serta

mengembangkan strategi menyuplai nutrisi agar sel tersebut tetap hidup dan agar sistem imun tidak menghancurkan sel kanker (Corwin, 2007).

Untuk hidup semua sel memerlukan suplai darah yang adekuat untuk mendapatkan oksigen, makanan, serta membuang zat-zat sisa. Begitu pula sel kanker, kecepatan pertumbuhannya sangat dipengaruhi oleh suplai darah serta letaknya di dalam tubuh. Jika sekelompok sel tumor mencapai ukuran tertentu dengan diameter sekitar 1 sampai 2 mm, maka suplai 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 (Corwin, 2007).

Pengukuran faktor angiogenesis tumor pada darah maupun urine, memungkinkan diagnosis dini dari beberapa kanker. Hal yang lebih menarik adalah pengobatan baru yang menghambat produksi faktor angiogenesis tumor. Eksperimen terakhir telah memperlihatkan bahwa tanpa angiogenesis, tumor segera menyusut dan terkadang menghilang (Corwin, 2007). Dalam penelitian sebelumnya telah dibuktikan bahwa Ekstrak etanolik daun sambung nyawa (*Gynura procumbens*) menurunkan respon angiogenesis pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam. Dimana ekstrak etanolik daun sambung nyawa (*Gynura procumbens*) mengandung berbagai senyawa kimia yang diduga mempunyai kemampuan menghambat angiogenesis, beberapa diantaranya adalah flavonoid yang merupakan golongan dari polifenol (Jenie *et al*, 2006).

Dalam tumbuhan tingkat tinggi, flavonoid terdapat pada bagian vegetatif maupun dalam bunga. Sebagai pigmen bunga flavonoid berperan dalam menarik burung dan serangga penyerbuk. Selain itu flavonoid juga berperan dalam pengaturan pertumbuhan, fotosintesis, antimikroba, dan antivirus (Robinson 1995). 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 (Paembong, 2012). Indonesia merupakan salah satu negara pembudidaya tanaman kakao paling luas di dunia dan termasuk negara penghasil kakao terbesar ketiga setelah Ivory Coast dan Ghana, yakni dengan nilai produksi tahunannya mencapai 572 ribu ton (Wahyudi *et al.*, 2009). Berdasarkan uraian di atas, penulis ingin mengetahui efek antiangiogenik ekstrak polifenol biji kakao (*Theobroma cacao*) pada CAM embrio ayam.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka permasalahan yang dapat dirumuskan adalah sebagai berikut:

- a. Apakah pemberian ekstrak polifenol kakao (*Theobroma cacao*) berpengaruh terhadap efek antiangiogenik pada *corio alantois membrane* (CAM) embrio ayam?
- b. Apakah peningkatan dosis pemberian ekstrak polifenol kakao (*Theobroma cacao*) berpengaruh terhadap peningkatan efek antiangiogenik *corio alantois membrane* (CAM) embrio ayam?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh ekstrak polifenol kakao (*Theobroma cacao*) terhadap efek antiangiogenik pada CAM embrio ayam.

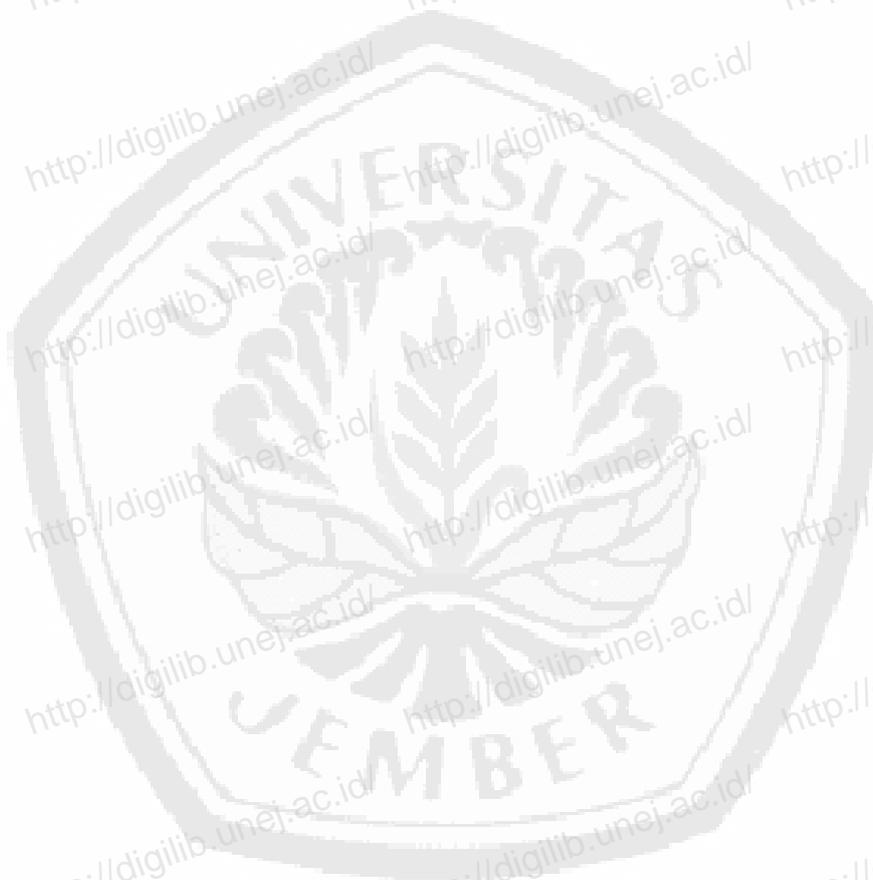
1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Mengetahui pengaruh ekstrak polifenol kakao (*Theobroma cacao*) terhadap perubahan jumlah pembuluh darah pada CAM embrio ayam.
- b. Mengetahui pengaruh peningkatan dosis pemberian ekstrak polifenol kakao (*Theobroma cacao*) terhadap peningkatan efek anti angiogenik pada CAM embrio ayam.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang bisa diambil dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Memberi informasi bagi masyarakat tentang efek antiangiogenik ekstrak polifenol kakao (*Theobroma cacao*).
- b. Dapat menjadi masukan bagi pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi kedokteran terutama pada pengobatan kanker.
- c. Sebagai dasar penelitian selanjutnya.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kakao

Sistematika tanaman kakao menurut Tjitrosoepomo (1988) adalah sebagai berikut:

Tabel 2.1 Klasifikasi ilmiah kakao

<i>Theobroma cacao</i>	
Divisi	: Spermatophyta
Anak divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Anak kelas	: Dialypetalae
Bangsa	: Malvales
Suku	: Sterculiaceae
Marga	: <i>Theobroma</i>
Jenis	: <i>Theobroma cacao</i> L
Sumber : Wahyudi <i>et al.</i> , 2009	

Tanaman kakao berasal dari hutan-hutan tropis di Amerika Tengah dan di bagian utara Amerika Selatan. Tanaman kakao pertama kali dibudidayakan serta digunakan sebagai bahan makanan dan minuman coklat oleh Suku Maya dan Suku Aztec. Saat itu biji kakao juga berfungsi sebagai alat barter, pembayar upeti, dan juga digunakan dalam kegiatan upacara keagamaan atau pengobatan. Pengenalan kakao di Eropa terjadi pada tahun 1528 sebagai persembahan orang-orang Spanyol yang pulang dari daratan Amerika kepada rajanya Charles V. Karena rasanya yang lezat coklat pun menjadi terkenal di Spanyol sebagai produk makanan dan minuman baru. Pada tahun 1550 penggunaan kakao semakin meluas hingga ke seluruh daratan Eropa. Selanjutnya perdagangan biji kakao di Amerika dan Eropa menjadi berkembang pesat (Wahyudi *et al.*, 2009).

Bangsa Spanyol juga yang memperkenalkan kakao di Indonesia, yaitu pada tahun 1560 di Celebes (sekarang Sulawesi), Minahasa. Indonesia merupakan salah satu negara pembudidaya tanaman kakao paling luas di dunia dan termasuk negara penghasil kakao terbesar ketiga setelah Ivory Coast dan Ghana, yakni dengan nilai produksi tahunannya mencapai 572 ribu ton. Berdasarkan data dari Direktorat Jenderal Perkebunan pada tahun 2003 luas area penanaman kakao telah mencapai 917 ribu hektar dan tersebar di seluruh provinsi, kecuali DKI Jakarta (Wahyudi *et al.*, 2009).

Sunanto (dalam Fatima, 2012), menyebutkan bahwa terdapat tiga jenis kakao yang banyak dibudidayakan, yaitu:

- a. Criollo, mempunyai buah berwarna merah atau hijau, bijinya berbentuk bulat telur dan berukuran besar dengan kotiledon berwarna putih pada waktu basah. Jenis ini menghasilkan biji kakao bermutu baik, seperti kakao mulia, disebut juga edel kakao;
- b. Forastero, mempunyai buah berwarna hijau, bijinya tipis gepeng dengan kotiledon berwarna ungu pada waktu masih basah. Biji yang dihasilkan dari jenis ini mempunyai mutu sedang atau dikenal dengan bulk kakao;
- c. Trinitario, adalah hasil persilangan alami antara criollo dan forastero. Trinitario mempunyai buah berwarna hijau atau merah dengan bentuk biji yang bermacam-macam. Kotiledonnya berwarna ungu muda sampai ungu tua pada waktu basah. Kakao jenis ini bisa menghasilkan biji dari yang bermutu sedang hingga yang bermutu baik.

Menurut Siregar (dalam Fatima, 2012), jenis kakao yang menghasilkan cita rasa coklat yang lembut dengan warna yang cerah adalah criollo, sedangkan jenis forastero memiliki cita rasa coklat yang kuat dan warna yang gelap, karena banyak mengandung polifenol dan antosianin. Buah kakao terdiri atas 3 komponen utama, yaitu kulit buah, plasenta dan biji. Kulit buah merupakan komponen terbesar dari buah kakao, yaitu lebih dari 70% berat buah masak. Prosentase biji kakao hanya sekitar 27-29%, sedang sisanya adalah plasenta yang merupakan pengikat dari 30-40 biji. Biji kakao dibungkus oleh daging buah (pulpa) yang berwarna putih. Buah yang masak dan siap dipanen ditandai dengan

berubahnya warna kulit buah dan biasanya biji ikut lepas dari kulit buah (Misnawi, 2010). Buah kakao akan masak setelah berumur 5-6 bulan. Pada saat buah masak ukuran buah yang terbentuk cukup beragam dengan ukuran berkisar 10-30 cm dan diameter 7-15 cm (Wahyudi *et al.*, 2009).

2.2 Polifenol Kakao

Senyawa fenol dalam tanaman dibagi dalam 3 kelompok besar yaitu asam fenol, flavonoid dan tanin. Senyawa fenol adalah substansi yang memiliki cincin benzene dengan satu atau lebih gugus hidroksil, termasuk turunan fungsionalnya. Fenol banyak memiliki efek menguntungkan bagi kesehatan, salah satunya adalah mengurangi resiko penyakit jantung dengan menghambat oksidasi LDL (low density lipoprotein). Sejumlah besar fenol baik yang memiliki berat molekul rendah maupun tinggi menunjukkan kemampuan sebagai antioksidan melawan oksidasi lipid. Selain itu senyawa fenol juga diketahui memiliki sifat antibakteri, antivirus, anti mutagenik dan antikarsinogenik (Supriyono 2008).

Menurut Forysth (dalam Hastuti, 2010), yang termasuk polifenol kakao adalah flavonoid dan asam fenol. Bubuk kakao mempunyai kandungan polifenol total lebih tinggi dibandingkan dengan anggur maupun teh hijau. Kim dan Keeney (dalam Misnawi, 2003) menyebutkan, berdasarkan percobaan kromatografi, dapat diidentifikasi konsentrasi polifenol utama dalam kakao Forastero yaitu delapan senyawa dalam tiga fraksi utama (katekin, leukosianidin dan antosianin) telah teridentifikasi. Fraksi lain yang bergerak sangat lambat dalam kromatografi kertas diduga sebagai tannin kompleks.

Tabel 2.2 Persentase kandungan polifenol kakao foraster

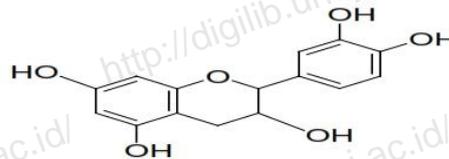
<i>Fraction Polyphenol</i>		<i>Precentage in</i>	
		<i>Dry Weight</i>	<i>Total</i>
Catechins	Epicatechin	-	-
	Catechin	2,75	35
	Gallocatechin	0,25	3
	Epigallocatechin	-	-
			33-42
Leucocyanidins	Leucocyanidins 1	1,6	21
	Leucocyanidins 2,3	0,8	10
			25-39
Antocyanins	3- α -L-Arabinosydl- cyaniding	0,3	2,5
	3- α -L-Arabinosydl- cyaniding	0,3	2,5
			5
Compleks tannins		2,0	24-40

Sumber : Kim dan Keeney (dalam Misnawi, 2003)

Flavonoid merupakan senyawa polar sehingga akan larut dalam pelarut polar seperti etanol, methanol, butanol, dan air. Senyawa ini dapat ditemukan pada batang, daun, bunga, buah, dan biji (Stauth, 2007). Menurut Harborne (dalam Doloksaribu, 2011), polifenol kakao utamanya flavonoid mempunyai potensi sebagai bahan antioksidan alami. Flavonoid umumnya dalam tumbuhan terikat pada gula yang disebut dengan glikosida. Markham (dalam Doloksaribu, 2011) berpendapat bahwa, pada flavonoida O-glikosida, satu gugus hidroksil flavonoid (atau lebih) terikat pada satu gula (lebih) dengan ikatan yang tahan asam. Pada flavonoid C-glikosida, gula terikat pada atom karbon flavonoid dan dalam hal ini gula tersebut terikat langsung pada inti benzena dengan suatu ikatan karbon-karbon yang tahan asam. Menurut Robinson (dalam Doloksaribu, 2011), flavonoid dapat dikelompokkan berdasarkan keragaman pada rantai C3 yaitu flavonol, flavon, isoflavon, flavanon, flavanonol, katekin, leukoantosianidin, antosianin, khalkon, dan auron.

2.2.1 Katekin

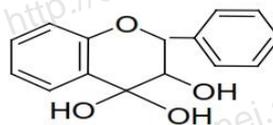
Katekin terdapat pada seluruh dunia tumbuhan, terutama pada tumbuhan berkayu. Senyawa ini mudah diperoleh dalam jumlah besar dari ekstrak kental *Uncaria gambir* dan daun teh kering yang mengandung kira-kira 30% senyawa ini. Katekin berkhasiat sebagai antioksidan. Katekin mempunyai rumus kimia $C_{15}H_{14}O_6$, tidak berwarna, dan dalam keadaan murni sedikit tidak larut dalam air dingin tetapi sangat larut dalam air panas, larut dalam alkohol dan etil asetat, hampir tidak larut dalam kloroform, benzene, dan eter. Struktur katekin, lihat Gambar 2.1. Menurut Wahluyo (dalam Setiadevi, 2010) katekin memiliki sifat sebagai antimikroba, memperkuat pembuluh darah, melancarkan air seni dan menghambat pertumbuhan sel kanker.



Gambar 2.1 Struktur katekin (Sumber: Doloksaribu, 2011)

2.2.1 Leukosianidin

Leuksianidin merupakan senyawa tan warna, terutama terdapat pada tumbuhan berkayu. Senyawa ini jarang terdapat sebagai glikosida, contohnya melaksidin, apiferol. Struktur Leukosianidin, lihat Gambar 2.2.

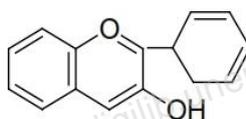


Gambar 2.2 Struktur leukoantosianin (Sumber: Doloksaribu, 2011)

2.2.2 Antosianin

Antosianin merupakan pewarna yang paling penting dan paling tersebar luas dalam tumbuhan. Pigmen yang berwarna kuat dan larut dalam air ini adalah

penyebab hampir semua warna merah jambu, merah marak, ungu, dan biru dalam daun, bunga, dan buah pada tumbuhan tinggi. Secara kimia semua antosianin merupakan turunan suatu struktur aromatik tunggal yaitu sianidin, dan semuanya terbentuk dari pigmen sianidin ini dengan penambahan atau pengurangan gugus hidroksil atau dengan metilasi atau glikosilasi. Struktur Leukosianidin, lihat Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Struktur antosianin (Sumber: Doloksaribu, 2011)

2.3 Tumor

2.3.1 Definisi Tumor

Tumor adalah jaringan baru (neoplasma) yang timbul dalam tubuh dan berasal dari sel tubuh kita sendiri akibat pengaruh berbagai faktor penyebab tumor. Faktor penyebab tumor menimbulkan mutasi gen pada sel tubuh sehingga menyebabkan bentuk, sifat, dan kinetiknya berubah sehingga tumbuhnya menjadi autonom, tak terkendali dan terlepas dari pertumbuhan normal. Penelitian menunjukkan timbulnya tumor merupakan hasil dari mutasi banyak gen dan melibatkan banyak tahapan. Mutasi gen yang berbeda dan intensitas mutasi yang berbeda menghasilkan jenis tumor yang berbeda (Sukardja, 2000; Desen, 2011).

2.3.2 Klasifikasi

Berdasarkan karakteristik tumor dan pengaruh serta ancumannya terhadap tubuh, tumor dibagi menjadi dua jenis, yaitu tumor jinak (benigna) dan ganas (maligna). Kanker adalah istilah umum untuk semua jenis tumor ganas. Perbedaan tumor jinak dan ganas, lihat Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Perbedaan tumor jinak dan ganas

	Tumor Jinak	Tumor Ganas
Diferensiasi tumor	Baik	tidak baik
Dismorfisme	Kecil	besar
Pembelahan inti	tidak ada/ sedikit	banyak, sering patologis
Pola pertumbuhan	eksofitik, ekspansif	infiltratif, invasif
Hubungan dengan jaringan	mendorong, mendesak	Merusak
Kapsul	sering ada	tidak ada
Batas	jelas	tidak jelas
Laju pertumbuhan	relatif lambat	Cepat
Residif dan metastasis	tidak ada/ sangat jarang	Sering

Sumber : Desen, 2011

2.4 Kanker

Kanker adalah pertumbuhan sel abnormal yang cenderung menyerang jaringan di sekitarnya dan menyebar ke organ tubuh lain yang letaknya jauh (Anonim, 2012). Nama *carcinus* atau *carcinoma* atau kanker pertama kali dipakai oleh Hippocrates seorang dokter Yunani 400 tahun SM, untuk suatu penyakit ganas, yaitu penyakit yang merusak dan dapat menyebar, yang pada waktu itu tidak dapat disembuhkan serta mematikan. *Carcinus* berarti yuyu. Penyakit itu seperti halnya yuyu sekali mencengkeram mangsanya tidak akan lepas sampai mati (Sukardja, 2000).

Menurut Tan (2010), kanker merupakan penyakit yang disebabkan oleh adanya gangguan pada proses pengendalian pertumbuhan, lokalisasi, dan kematian sel normal. Hilangnya mekanisme pengendalian normal ini ditimbulkan karena adanya mutasi pada 3 kelompok gen :

- a. Proto-onkogen, merupakan gen yang mengkode protein-protein yang berperan dalam mengatur proliferasi sel. Mutasi pada onkogen dapat menyebabkan ketidakteraturan proliferasi sel. Kelompok gen proto-onkogen yang mengalami mutasi disebut onkogen.

- b. Gen tumor suppressor, merupakan kelompok gen yang berperan dalam mengatur siklus sel. Pada kanker, mutasi pada gen tumor suppressor menyebabkan deregulasi pengendalian siklus sel, dan adhesi sel.
- c. Enzim-enzim yang berperan untuk perbaikan DNA. Mutasi pada gen-gen ini dapat menginduksi terjadinya instabilitas genetik.

Perubahan aktivitas gen-gen ini menyebabkan peningkatan deregulasi proliferasi yang diikuti dengan proliferasi abnormal dan hilangnya apoptosis sel (Tan, 2010).

2.4.1 Proliferasi Sel

Pertumbuhan jaringan serta organ terjadi karena penambahan ukuran, jumlah sel atau keduanya yang dialami kelompok populasi sel yang aktif melakukan siklus sel atau berproliferasi. Manusia dewasa merupakan hasil pertumbuhan akibat penambahan sebanyak 10^{15} sel dari sebuah sel yang dibuahi, disamping terdapat juga faktor penambahan ukuran sel sebanyak 3-4 kali semenjak manusia dilahirkan. Setelah manusia dewasa, maka jumlah sel relatif tetap dan tidak terjadi lagi pertumbuhan, walaupun pada keadaan ini tetap terjadi pembelahan sel (mitosis). Mitosis merupakan bagian dari proses proliferasi. Pembelahan sel pada manusia dewasa bertujuan untuk menggantikan sel mati sebanyak 10^{12} setiap harinya, yang dapat diakibatkan oleh proses apoptosis maupun nekrosis. Keseimbangan dalam pertumbuhan ini harus terkontrol. Bila jumlah sel yang mati lebih banyak, maka akan terjadi penciutan jaringan atau organ, yang biasanya terjadi secara menyeluruh pada orang tua. Bila sel yang diproduksi lebih banyak dari yang seharusnya maka akan terjadi pertumbuhan jaringan (Gondhowihardjo, 2010).

Mutasi yang mengaktifkan proto-onkogen akan mengakibatkan aktivasi komponen-komponen kaskade sinyal yang merangsang reseptor faktor pertumbuhan ke arah pembelahan sel. Di lain pihak, mutasi pada gen supresor menyebabkan supresi terhadap pertumbuhan sel akan hilang. Komponen komponen tersebut merupakan sasaran lesi onkogenik yang paling sering terjadi (Gondhowihardjo, 2010).

2.4.2 Apoptosis

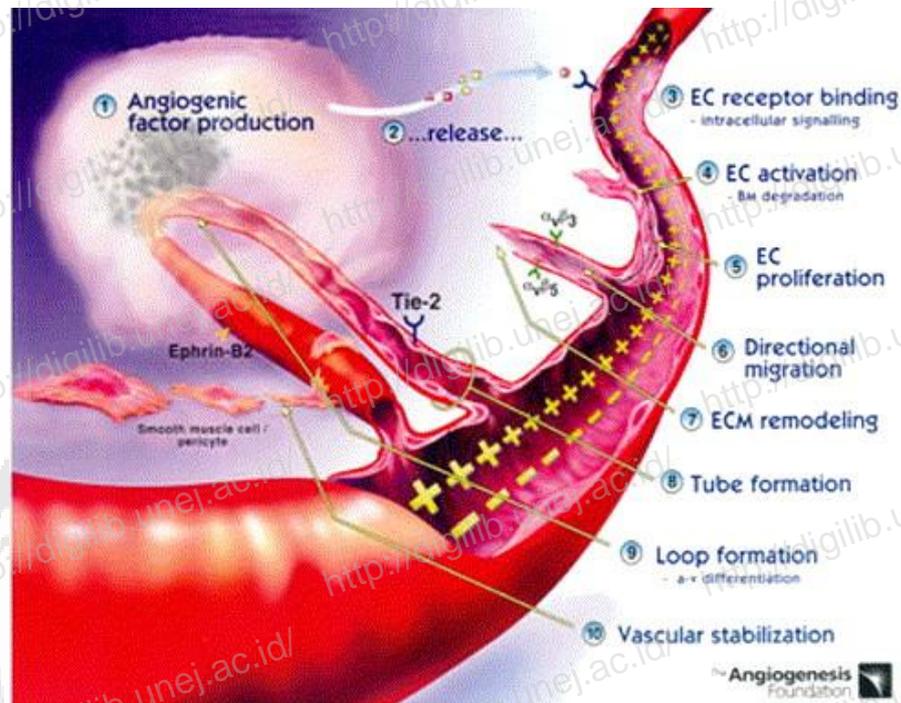
Apoptosis adalah suatu proses bunuh diri dengan sukarela yang bersifat fisiologis dan umum terjadi pada organisme multi seluler. Apoptosis berfungsi untuk mengakomodasi jutaan sel-sel baru yang diproduksi setiap hari. Apoptosis sama pentingnya seperti proses pembelahan sel dan migrasi sel, karena proses kematian sel yang teratur ini merupakan proses penting yang berperan pada masa perkembangan organ, seperti pada pembentukan jari-jemari, serta untuk membatasi jumlah sel dengan ketat. Terlalu banyak apoptosis dapat menyebabkan atrofi jaringan dan inaktivasi dari organ vital. Terlalu sedikit apoptosis dapat berakibat hiperplasia, seperti yang terjadi pada kanker dan penyakit autoimun. Kegagalan jalur apoptosis normal akan memperpanjang hidup suatu sel, mengarah ke keganasan, dan menyebabkan sel resisten terhadap penghancuran oleh sistem imun (Malik, 2010).

2.3.3 Angiogenesis

Angiogenesis adalah pembentukan pembuluh darah baru yang berasal dari pembuluh darah yang sudah ada, bisa bersifat fisiologis maupun patologis. Proses fisiologis dalam tubuh manusia terjadi pada saat janin berada di dalam uterus, setiap siklus menstruasi, serta regenerasi jaringan pada saat penyembuhan luka. Sedangkan proses yang patologis terjadi pada tumor yang memerlukan vaskularisasi untuk perkembangannya maupun metastasis (Hardjolukito *et al.*, 2010).

Mekanisme angiogenesis, lihat gambar 2.4. Mekanisme angiogenesis dimulai dengan perubahan pada permukaan sel endotel, vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas kapiler yang dapat memicu ekstrasvasi plasma protein. Selain itu sel endotel juga menghasilkan enzim proteinase. Kemudian terjadilah proses distabilisasi membran basalis oleh enzim proteinase yaitu matriks metalloproteinase (MMP) yang mengakibatkan endothelial sel terpisah satu sama lain dan bermigrasi. Sekali teraktivasi maka proses ini terus berjalan menimbulkan percabangan dan membentuk lubang pembuluh darah. Proses ini disempurnakan dengan pembentukan pericytes dan sel otot polos serta organisasi pembuluh darah

yang baru membentuk jaringan seperti tiga dimensi sehingga aliran darah dapat berlangsung (Padya *et al*, 2006).



Gambar 2.4 Mekanisme Angiogenesis (Sumber: Angiogenesis foundation, 2009)

2.5 Angiogenesis Pada Tumor

Dalam perkembangannya tumor akan melalui dua fase, yaitu prevaskuler dan vaskuler. Pada fase prevaskuler tumor tidak bersifat angiogenik, pertumbuhan lambat, ukuran kecil, berlangsung lama, tidak menimbulkan gejala klinik. Tumor kemudian dapat mengalami perubahan memasuki fase vaskuler. Tumor pada fase vaskuler akan tumbuh cepat, mampu menginvasi jaringan sekitar bahkan bermetastasis. Tumor membutuhkan angiogenesis untuk tumbuh di atas ukuran 1-2 mm. Neovaskularisasi pada sel tumor dipengaruhi oleh faktor tumor dan faktor pejamu. Sel tumor menghasilkan b-FGF dan VEGF / VPF, suatu stimulator angiogenesis (*angiogenic growth factor*) sedangkan pejamu menghasilkan enzim proteolitik matriks ekstraseluler yaitu MMP (Hardjolukito *et al.*, 2010).

Hubungan antara tumor dengan mekanisme angiogenesis dapat terjadi dalam beberapa tahapan berikut : mula-mula tumor melepaskan *angiogenic*

growth factor yang berdifusi ke jaringan disekitar tumor yang akan berikatan dengan reseptor pada sel endotel yang berdekatan. Sekali reseptor ini berikatan dengan *growth factor*, maka sel endotel ini akan teraktivasi dan akan memberikan sinyal ke inti sel, kemudian terjadi perubahan pada permukaan sel endotel, vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas kapiler yang dapat memicu ekstravasasi plasma protein. Selain itu sel endotel juga menghasilkan enzim proteinase. Kemudian terjadilah proses distabilisasi membran basalis oleh enzim proteinase yaitu matriks metalloproteinase (MMP) yang mengakibatkan endothelial sel terpisah satu sama lain dan bermigrasi kearah luar mendekati masa tumor. Proses ini disempurnakan dengan pembentukan pericytes dan sel otot polos serta organisasi pembuluh darah yang baru membentuk jaringan seperti tiga dimensi sehingga aliran darah dapat berlangsung (Padya *et al*, 2006).

Neovaskularisasi tumor akan memacu pertumbuhan yang lebih cepat dan akan memberi peluang untuk membentuk subpopulasi sel dengan potensi metastasis tinggi. Subpopulasi sel ini dilengkapi dengan sejumlah enzim proteolitik yang dapat merusak membran basal dan matriks-matriks ekstrasel (Hardjolukito *et al.*, 2010). Menurut Hiclin DJ (2005) angiogenesis diperlukan untuk suplai oksigen, nutrien, faktor pertumbuhan dan hormon, enzim proteolitik, mempengaruhi faktor hemostatik yang mengontrol koagulasi dan sistem fibrinolitik, dan penyebaran sel-sel tumor ke tempat jauh (Farhat, 2009).

Makna klinis dari angiogenesis pada tumor ini antara lain sebagai peramal prognosis yaitu dengan menerapkan MDV (microvessel density) dan penetapan kadar faktor-faktor angiogenik dalam serum atau urin, serta perencanaan terapi melalui manipulasi berbagai tahap angiogenesis. Terapi dengan pendekatan antiangiogenik mengandung hal-hal yang menguntungkan karena bersifat selektif, tidak toksik seperti sitostatika atau radioterapi, terhindar dari resiko mengalami resistensi obat sehingga dapat diberikan dalam jangka panjang dan tidak ada dosis maksimal (Hardjolukito *et al.*, 2010).

2.6 Matrix Metalloproteinase

Matrix metalloproteases (MMPs) atau matrixin merupakan zinc dependent endopeptidase yang merupakan protein utama yang berperan dalam degradasi matriks ekstraselular. Matrix metalloproteinases (MMPs) mampu untuk mendegradasi molekul ekstraselular secara luas. Matrix metalloproteinases (MMPs) memegang peranan penting dalam proliferasi sel, migrasi, diferensiasi, angiogenesis, apoptosis dan pertahanan tubuh. Disregulasi dari matrix metalloproteinases (MMPs) memiliki implikasi dalam berbagai penyakit termasuk arthritis, ulkus kronik, encephalomyelitis dan kanker. Invasi tumor, metastasis dan angiogenesis terjadi melalui degradasi dari matrik ekstraselular dan peningkatan ekspresi dari matrix metalloproteinase (Piasiska, 2011).

Famili matrix metalloproteinases (MMPs) terdiri dari lebih dari 20 related zinc dependent enzymes. Enzim ini memiliki nama deskripsi berdasarkan substrat dan sistem penomoran matrix metalloproteinases (MMPs) berdasarkan pada urutan ditemukan. Matrix metalloproteinases (MMPs) memiliki karakteristik memiliki kemampuan mendegradasi protein matrix ekstraselular termasuk kolagen, laminin, fibronectin, vitronectin, aggrecan, enactin, tenascin, elastin dan proteoglycans. Sekarang ini, dikatakan bahwa matrix metalloproteinases (MMPs) dapat memecah banyak tipe dari peptida dan protein dan memiliki kemampuan penting lain berupa aktivitas proteolitik yang bebas. Pembagian Matrix metalloproteinase ;

- a. Collagenase (MMP-1, -8 and -13)
- b. Gelatinase (MMP-2 and MMP-9)
- c. Stromelysins (MMP-3, -10 and -11)
- d. Matrilysin (MMP-7 and MMP-26)
- e. Membran-type (MT)-MMPs (MMP-14, -15, -16, -17, -24 and -25)
- f. Lainnya (MMP-12, -19, -20, -21, -23, -27 and -28)

Pada keadaan normal, matrix metalloproteinases (MMPs) diproduksi oleh jaringan ikat yang berperan untuk proses remodeling jaringan, pada siklus menstruasi, dan merupakan bagian dari proses perbaikan pada kerusakan jaringan. Kemampuan destruksi matrix metalloproteinases (MMPs) terutama fokus pada

berbagai penelitian dengan kerusakan pada jaringan ikat (seperti rheumatoid artritis, kanker dan penyakit-penyakit periodontal). Leukosit terutama makrofag, merupakan sumber utama penghasil matrix metalloproteinases (MMPs). Matrix metalloproteinase (MMPs) yang dikeluarkan oleh leukosit memegang peranan penting dalam perpindahan leukosit dari pembuluh darah dan penetrasi ke jaringan, merupakan kunci dari penyakit radang. Opdenakker menunjukkan bahwa kerja matrix metalloproteinases (MMPs) tidak hanya mengizinkan emigrasi leukosit ke jaringan dan menyebabkan kerusakan jaringan, namun juga menghasilkan fragmen imunogenik dari protein normal yang dapat memperhebat penyakit autoimun. Dengan cara yang sama, metastase sel-sel kanker juga menggunakan MMPs untuk keluar dari jaringan dan untuk pembentukan pembuluh darah (Piasiska, 2011).

Matrix metalloproteinases (MMPs) menaikkan progresivitas dan metastasis pada kanker invasif dengan mendegradasi matrik ekstraselular, terdiri dari 2 komponen utama yaitu membran basal dan jaringan ikat interstitial. Matrik ekstraselular sendiri terdiri dari banyak protein (laminin-5, proteoglican, entactin, osteonectin), kolagen tipe IV merupakan elemen utama. matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) dan matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) yang berfungsi mendegradasi kolagen tipe IV dan laminin-5, membantu sel-sel kanker bermetastase, namun juga menyebabkan peningkatan pertumbuhan tumor dengan membentuk ruangan yang penting. Kemudian, rasio peningkatan matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) dari bentuk aktif ke laten berhubungan dengan progresi tumor pada kanker-kanker invasif. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) dan anggota famili yang lain juga menyebabkan angiogenesis (proses penting dalam pertahanan tumor) dengan mendegradasi membran basal interstitium dan juga mengeluarkan VEGF, yang diketahui sebagai molekul angiogenik. Lokasi matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) pada permukaan sel dibutuhkan untuk meningkatkan invasi tumor dan angiogenesis (Piasiska, 2011).

Sebagian besar matrix metalloproteinases (MMPs) diproduksi oleh sel stroma di bandingkan sel-sel kanker. Penjelasan untuk fenomena ini adalah sel sel kanker memproduksi Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer

(EMMPRIN), yang merupakan glikoprotein pada permukaan sel, yang distimulasi langsung oleh fibroblast (melalui kontak langsung) untuk memproduksi MMP1,2,3 dan MMP14. EMMPRIN juga meningkat pada sel-sel radang dan dapat diimplikasikan pada kerusakan jaringan (Piasiska, 2011).

2.7 Metode Ekstraksi

Menurut Ningsih et al. (2009), ekstrak adalah sediaan pekat dari hasil ekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian sebagian besar dari pelarut akan diuapkan dan serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa sampai memenuhi baku yang ditetapkan. Proses ekstraksi dapat dilakukan berdasarkan teori penyarian. Penyarian merupakan peristiwa pemindahan masa. Zat aktif yang berada di dalam sel, ditarik keluar oleh cairan penyarian sehingga terjadi larutan zat aktif dalam larutan tersebut. Metode yang akan digunakan pada penelitian ini adalah metode maserasi.

Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana, yaitu dengan merendam serbuk simplisata dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel, zat aktif yang terkandung dalam rongga sel akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan luar sel, maka larutan yang ada di dalam akan didesak keluar hingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di dalam sel dan di luar sel. Cairan penyari yang dapat digunakan berupa air, etanol, dan pelarut lain. Keuntungan cara penyarian dengan metode ini adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah dilakukan. Sedangkan kerugiannya adalah pengerjaannya lama dan penyariannya kurang sempurna (Ningsih et al., 2009).

2.8 Antiangiogenik

Sejak lama sasaran terapi kanker semata-mata adalah mengupayakan kematian sel kanker secara langsung. Namun hal ini ternyata tidak selektif sehingga pendekatan tersebut juga mengakibatkan efek toksik yang cukup

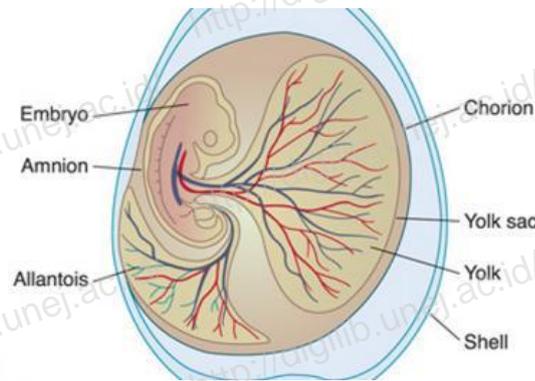
bermakna untuk sel normal lainnya, dan bagi penderitanya sendiri secara menyeluruh. Kesulitan menjadi bertambah dengan kenyataan bahwa mutasi sel kanker dapat senantiasa terjadi sehingga timbul resistensi terhadap pengobatan (Hardjolakito *et al.*, 2010).

Dengan berkembangnya pengetahuan mengenai angiogenesis maka diharapkan dapat diupayakan terapi dengan memanipulasi mekanisme angiogenesis, atau menjadikan endotel mikrovaskuler tumor sebagai sasaran ke-2. Pemikiran ini cukup beralasan mengingat juga terdapatnya efek parakrin dari endotel mikrovaskuler tumor yang memacu pertumbuhan tumor melalui faktor-faktor pertumbuhan. Pendekatan ini dianggap lebih menguntungkan oleh karena efek obat antiangiogenesis tidak dipengaruhi oleh mutasi sel kanker, endotel dianggap lebih stabil atau bahkan mungkin tidak akan bermutasi, sehingga pemberiannya pun dapat dilakukan dalam jangka waktu yang lama tanpa kekhawatiran akan terjadi resistensi maupun efek toksik. Kelebihan yang lain adalah pengobatannya tidak bergantung kepada jenis tumor dan tidak dikenal dosis maksimum (Hardjolakito *et al.*, 2010).

Menurut cara kerjanya angiogenesis inhibitor dibedakan menjadi direk dan indirek. Inhibitor yang bekerja secara direk adalah yang menghambat migrasi atau proliferasi endotel akibat rangsangan VEGF-bFGF, seperti TNP 470, angiostatin dan endostatin. Sedangkan yang bekerja secara indirek adalah yang menetralkan faktor-faktor pertumbuhan endotel yang dikeluarkan oleh sel tumor, seperti interferon alfa yang menghambat produksi bFGF, dan anti c-erbB2 yang menghambat produksi VEGF (Hardjolakito *et al.*, 2010).

2.9 Membran Korio Alantois Telur Ayam Berembrio

Korion merupakan suatu selaput yang berada di sebelah luar amnion dan merupakan selaput embrio terluar. Bersama alantois berada di bawah pori-pori cangkang dan berfungsi untuk respirasi (Anonim). Gambar embrio ayam, lihat Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Embrio ayam

2.10.1 Perkembangan Embrio Unggas Dari Hari ke Hari

Berikut ini Perkembangan embrio dari hari ke hari (Bachtiar, 2003):

a. Hari Pertama :

Asal mula lempengan embrio pada tahap blastodermal. Nampak ada rongga segmentasi yang berada di bawah area pelucida, terdapat pada cincin yang berwarna lebih gelap dari sekitarnya.

b. Hari kedua :

Nampak jalur pertama pada pusat blastoderm. Diantara extraembryonic annexis nampak membran vitelin yang memiliki peranan utama dalam nutrisi embrio.

c. Hari ketiga :

Embrio berada di sisi kiri, dikelilingi oleh sistem peredaran darah, membran viteline menyebar di atas permukaan kuning telur. Kepala dan badan dapat dibedakan, demikian juga otak. Nampak juga struktur jantung yang mulai berdenyut.

d. Hari keempat :

Perkembangan rongga amniotik, yang akan mengelilingi embrio, yang berisi cairan amniotik, berfungsi untuk melindungi embrio dan membebaskan embrio bergerak. Nampak gelembung alantois yang berperan utama dalam penyerapan kalsium, pernapasan dan tempat penyimpanan sisa-sisa.

e. Hari kelima :

Peningkatan ukuran embrio, embrio membentuk huruf C, kepala bergerak mendekati ekor. Terjadi perkembangan sayap.

f. Hari keenam :

Membran viteline terus berkembang dan mengelilingi lebih dari separuh kuning telur. Fissura ada diantara jari pertama, kedua dan ketiga dari anggota badan bagian atas dan antara jari kedua dan ketiga anggota badan bagian bawah. Jari kedua lebih panjang dari jari lain.

g. Hari ketujuh :

Cairan yang makin mengencer di bagian leher. Nampak jelas memisahkan kepala dengan badannya. Terjadi pembentukan paruh. Otak nampak ada di daerah kepala yang lebih kecil ukurannya dibanding dengan badan embrio.

h. Hari kedelapan :

Membran vitellin menyelimuti (menutupi) hampir seluruh kuning telur. Pigmentasi pada mata mulai nampak. Bagian paruh atas dan bawah mulai terpisah, demikian juga dengan sayap dan kaki. Leher merenggang dan otak telah berada di dalam rongga kepala. Terjadi pembukaan indra pendengar bagian luar.

i. Hari kesembilan :

Kuku mulai nampak, mulai tumbuh folikel bulu pertama. Alantois mulai berkembang dan meningkatnya pembuluh darah pada vitellus.

j. Hari kesepuluh :

Lubang hidung masih sempit. Terjadi pertumbuhan kelopak mata, perluasan bagian distal anggota badan. Membran viteline mengelilingi kuning telur dengan sempurna. Folikel bulu mulai menutup bagian bawah anggota badan. Patuk paruh mulai nampak.

k. Hari kesebelas :

Lubang palpebral memiliki bentuk elips yang cenderung menjadi encer. Alantois mencapai ukuran maksimal, sedangkan vitellus makin menyusut. Embrio sudah nampak seperti anak ayam.

l. Hari kedua belas :

Folikel bulu mengelilingi bagian luar indera pendengar meatus dan menutupi kelopak mata bagian atas. Kelopak mata bagian bawah menutupi 2/3 atau bahkan bagian kornea.

m. Hari ketiga belas :

Alantois menyusut menjadi membran Chorioalantois. Kuku dan kaki mulai nampak jelas.

n. Hari keempat belas :

Bulu-bulu halus hampir menutupi seluruh tubuh dan berkembang dengan cepat.

o. Hari kelima belas dan enam belas:

Beberapa morfologi embrio berubah: anak ayam dan bulu halus terus berkembang. Vitellus menyusut cepat, putih telur mulai menghilang. Kepala bergerak ke arah kerabang telur (posisi pipping) di bawah sayap kanan.

p. Hari ketujuh belas :

Sistem ginjal dari embrio mulai memproduksi urates (garam dari asam urat). Paruh yang berada di bagian bawah sayap kanan, menuju rongga udara (yang ada di dalam telur). Putih telur telah terserap semua.

q. Hari kedelapan belas :

Permulaan internalisasi vitellin. Terjadi pengurangan cairan amniotik. Pada umur ini dilakukan transfer dari mesin setter (inkubator) ke mesin hatcher dan juga bisa dilakukan vaksin in ovo.

r. Hari kesembilan belas :

Penyerapan vitellin secara cepat. Paruh mulai mematuk selaput/membran kerabang bagian dalam dan siap untuk menembusnya. Penyerapan vitellin mulai cepat.

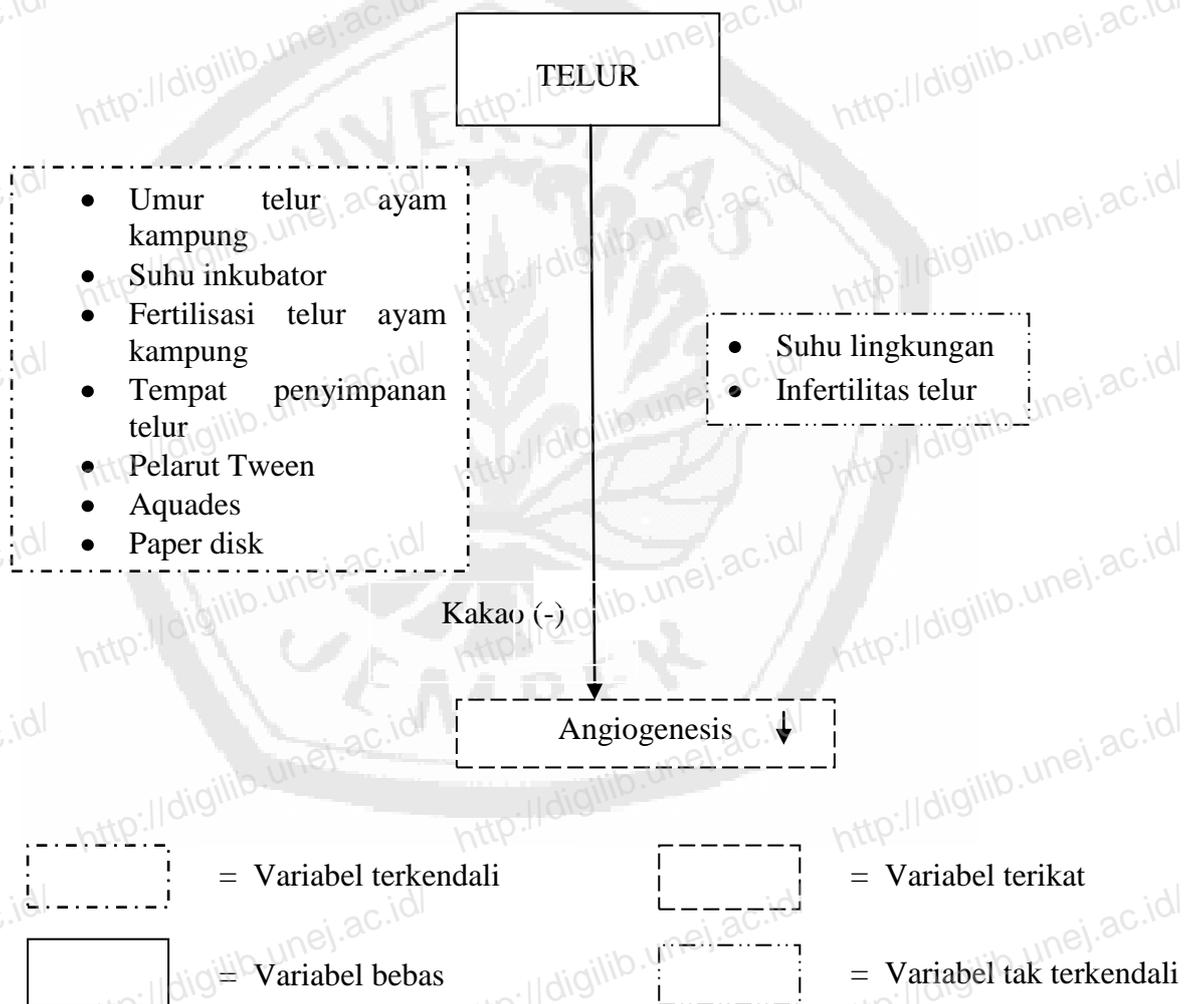
s. Hari kedua puluh :

Vitelus terserap semua, menutup pusar (umbilicus). Anak ayam menembus selaput kerabang telur bagian dalam dan bernafas pada rongga udara. Pertukaran gas terjadi melalui kerabang telur. Anak ayam siap menetas dan mulai memecah kerabang telur.

t. Hari kedua puluh satu :

Anak ayam menggunakan sayap sebagai pemandu dan kakinya memutar balik, paruh memecah kerabang dengan cara sirkular. Anak ayam mulai melepaskan diri dari kerabang telur dalam waktu 12 - 18 jam dan membiarkan bulunya menjadi kering.

2.10 Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 2.6 Skema kerangka konseptual penelitian

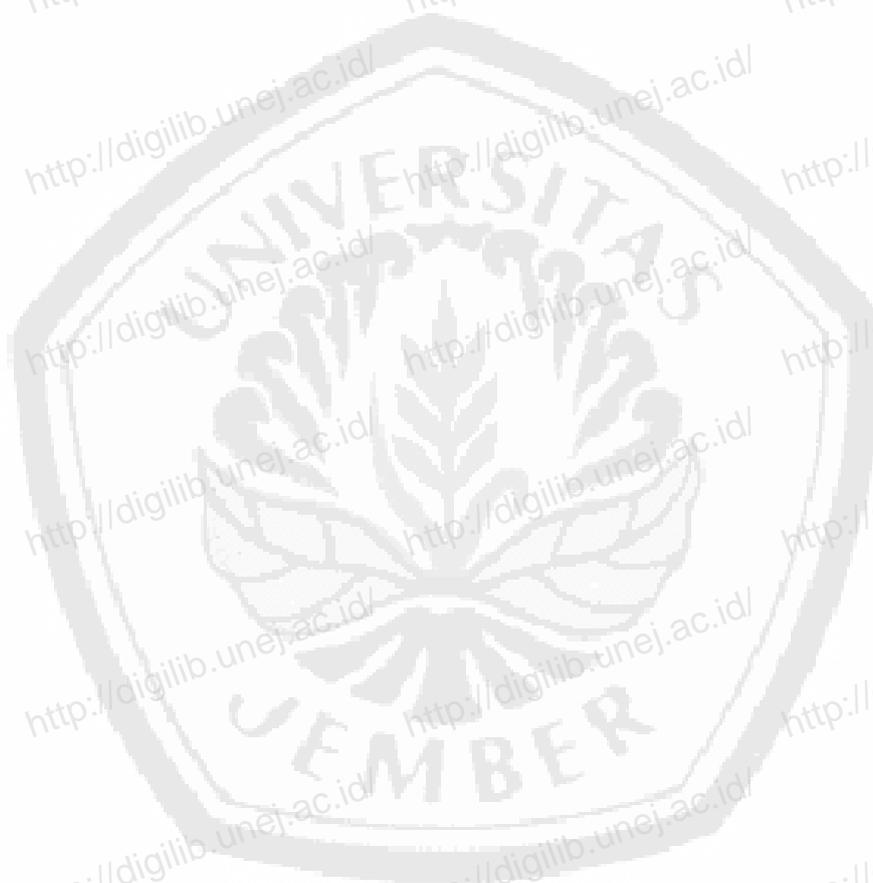
Menurut Kim dan Keeney (dalam Misnawi, 2003), katekin adalah senyawa polifenol terbanyak yang terdapat dalam kakao yaitu sekitar 33-42%, lebih banyak dibandingkan senyawa polifenol lain yang terdapat pada kakao. Penelitian oleh Tjaderhane dkk (1998) memberi informasi bahwa yang berperan dalam degradasi matriks dentin adalah MMP. Matriks metalloproteinase (MMP) yang teridentifikasi pada demineralisasi karies dentin antara lain MMP-2 dan MMP-9 berperan pada degradasi gelatin dentin, MMP-8 berperan pada degradasi kollagen dentin. Fajriani dkk telah meneliti tentang efek katekin teh hijau dalam penghambatan karies gigi, dan terbukti dapat menghentikan proses karies aktif dengan menghambat aktifitas MMP-8 dan kemungkinan besar juga menghambat MMP-2. Penelitian Vayalli 2004 membuktikan bahwa pemberian katekin teh hijau lewat mulut juga menghasilkan penghambatan ekspresi MMP pendegradasi matriks imbas UVB, seperti MMP-2 (67%), MMP-3 (63%), MMP-7 (62%), dan MMP-9 (60%) pada kulit mencit yang tidak berambut (Fajriani *et al*, 2011).

Enzim matriks metalloproteinase (MMP) merupakan protein utama yang berperan dalam degradasi matriks ekstraseluler. Seperti yang telah dibahas sebelumnya selain yang telah diuraikan di atas, MMP juga berperan dalam proses angiogenesis secara normal dan dalam angiogenesis tumor. Dimana pada proses pembentukan pembuluh darah salah satu yang terjadi adalah adanya degradasi membran basalis akibat aktivasi endotel yang mengeluarkan suatu enzim proteinase. Seperti diungkapkan Puspitasari (2012) enzim proteinase yang berperan pada proses degradasi ini salah satunya adalah matriks metalloproteinase-9 (MMP-9). Dengan adanya hambatan dari katekin kakao yang terdapat dalam ekstrak polifenol biji kakao yang diimplantasikan ke dalam membran korio alantois diharapkan dapat menghambat enzim MMP yang berperan dalam angiogenesis, sehingga pembentukan pembuluh darah baru dapat dihambat.

2.12 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dalam penelitian ini adalah:

- a. Ekstrak polifenol kakao (*Theobroma cacao*) memiliki efek antiangiogenik pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam.
- b. Peningkatan dosis pemberian ekstrak polifenol kakao (*Theobroma cacao*) berpengaruh terhadap peningkatan efek antiangiogenik pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian *true experimental*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Waktu pelaksanaannya adalah bulan September 2012 – Oktober 2012.

3.3 Sampel Penelitian

3.3.1 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah telur ayam kampung berembrio usia 1 hari.

3.3.2 Jumlah Sampel

Jumlah sampel ditentukan dengan menggunakan rumus federer :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$5(r-1) \geq 15$$

$$5r-5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$R \geq 4$$

Dimana :

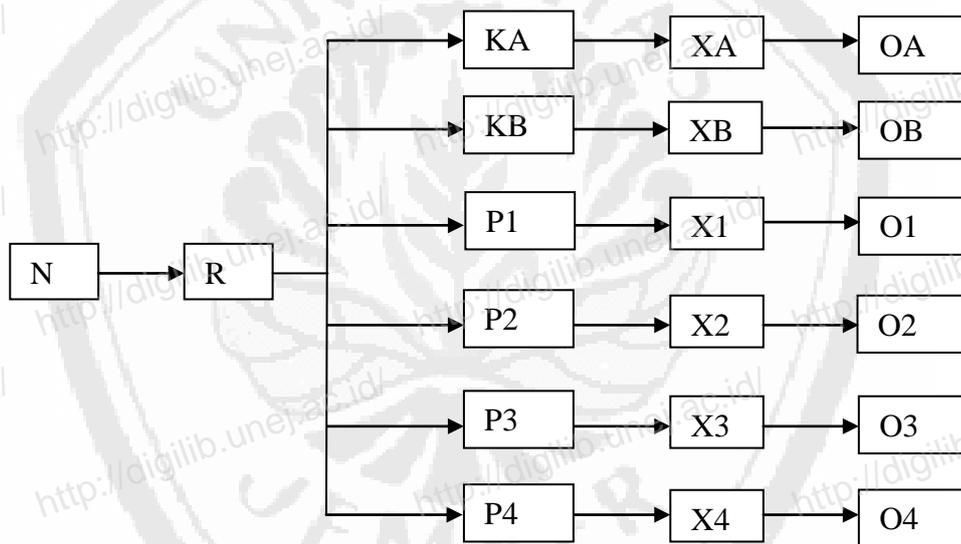
t : jumlah kelompok

r : jumlah sampel per kelompok

Besar sampel yang dibutuhkan berdasarkan perhitungan dengan rumus diatas minimal sebanyak 4 butir telur untuk masing-masing kelompok. Jadi, dalam penelitian ini digunakan 4 butir telur dalam setiap kelompok perlakuan. Sehingga jumlah sampel keseluruhan untuk 6 kelompok perlakuan adalah 24 butir telur.

3.4 Rancangan Penelitian

Jenis rancangan penelitian yang digunakan adalah *The Posttest Only Control Group Design*. Secara skematis rancangan penelitian dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 3.1 Rancangan skematis penelitian

Keterangan:

N : Sampel

R : Pengelompokan telur secara *simple random sampling*

K A: Kelompok kontrol aquades + tween 80%

K B: Kelompok kontrol tanpa perlakuan

P1: Kelompok perlakuan 1

P2: Kelompok perlakuan 2

P3: Kelompok perlakuan 3

P4: Kelompok perlakuan 4

XA: Perlakuan dengan implantasi aquades + tween 80%

XB: Tanpa perlakuan

X1 : Perlakuan dengan implantasi paper disk termuati ekstrak kakao (*Theobroma cacao*) dengan konsentrasi 100 mg/ml

X2: Perlakuan dengan implantasi paper disk termuati ekstrak kakao (*Theobroma cacao*) dengan konsentrasi 50 mg/ml

X3: Perlakuan dengan implantasi paper disk termuati ekstrak kakao (*Theobroma cacao*) dengan konsentrasi 25 mg/ml

X4: Perlakuan dengan implantasi paper disk termuati ekstrak kakao (*Theobroma cacao*) dengan konsentrasi 5 mg/ml

OA: Data kelompok kontrol A

OB: Data kelompok kontrol B

O1: Data kelompok perlakuan 1

O2: Data kelompok perlakuan 2

O3: Data kelompok perlakuan 3

O4: Data kelompok perlakuan 4

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas dan Variabel Terikat

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak polifenol biji kakao.

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pembentukan pembuluh darah baru.

3.5.2 Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah suhu inkubator, fertilisasi telur ayam kampung, tempat penyimpanan telur, pelarut tween 80%, aquades, *paper disk*, kasa steril, kertas tisu, methanol, aseton.

3.6 Definisi Operasional

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

3.7 Alat dan Bahan

3.7.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah beaker kaca, inkubator, lemari pendingin, sentrifuge, *disposable centrifuge tube*, timbangan/neraca, mikropipet, spuit 3cc, kertas tisu, kasa steril, isolatip, gunting, kantong plastik ukuran 1kg, pisau cutter, kamera digital.

3.7.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah telur ayam kampung fertile, aquadest steril, tween 80%, ekstrak polifenol kakao, paper disk, pengawet membrane CAM: aseton + methanol 1:1, larutan antiseptik: alkohol 70%.

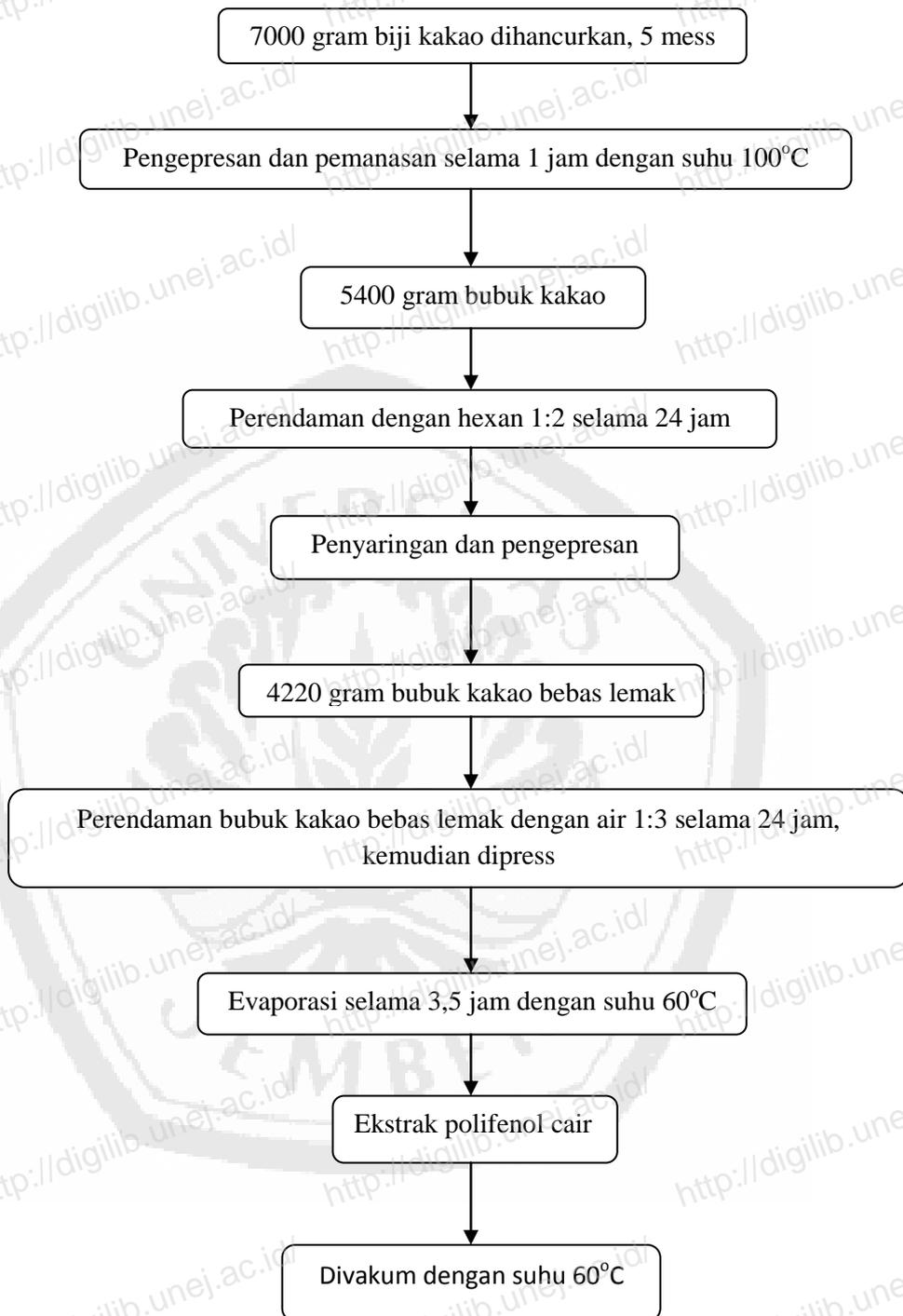
3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Pembuatan Ekstrak Polifenol Biji Kakao

Biji kakao basah dicuci bersih lalu dijemur selama 2 hari. 7000 gram biji kakao dipress 5 mess dan dioven selama 1 jam dengan suhu 60-100°C untuk memudahkan proses pengepresan. Biji kakao dipisahkan dengan lemak kakao menggunakan press hidrolis dan menghasilkan bubuk kakao. Kemudian bubuk kakao direndam dengan hexan selama 24 jam dengan perbandingan 1:2. Larutan yang diperoleh disaring dan di press menggunakan press hidrolis sehingga diperoleh bubuk kakao bebas lemak. Bubuk ini direndam dengan etanol 90%

selama 24 jam dengan perbandingan 1:3 sehingga dihasilkan larutan polifenol yang bercampur dengan etanol. Kemudian larutan polifenol dievaporasi menggunakan evaporator dengan suhu 60°C dan menghasilkan ekstrak polifenol cair yang sesungguhnya. Kemudian ekstrak tersebut divakum sehingga terbentuk serbuk.





Gambar 3.2 Skema pembuatan ekstrak polifenol biji kakao

3.8.2 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Polifenol Biji Kakao

- a. Ekstrak polifenol biji kakao (serbuk) ditimbang sebanyak 100 mg lalu ekstrak tersebut dimasukkan ke dalam *disposable centrifuge* tube I, ditambahkan dengan pelarut tween 80% 10 μ l kemudian diberi aquades steril sampai volume mencapai 1 ml,
- b. Setelah itu dikocok kemudian disentrifuge sehingga ekstrak tersebut memiliki konsentrasi 100 mg/ml.
- c. Dari hasil sentrifuge tersebut diambil 500 μ l dan dimasukkan ke dalam *disposable centrifuge* tube II, setelah itu ditambahkan 500 μ l aquades steril dan dicampur sampai tercampur sehingga ekstrak tersebut memiliki konsentrasi 50 mg/ml.
- d. Dari disposable centrifuge tube II diambil 250 μ l dan dimasukkan ke dalam *disposable centrifuge tube* II, setelah itu ditambahkan 250 μ l aquades steril lalu dicampur sampai tercampur sehingga ekstrak tersebut memiliki konsentrasi 25 mg/ml.
- e. Dari disposable centrifuge tube II diambil 125 μ l dan dimasukkan ke dalam *disposable centrifuge tube* III, setelah itu ditambahkan 375 μ l aquades steril lalu dicampur sampai tercampur.
- f. Dari disposable centrifuge tube III diambil 50 μ l dan dimasukkan ke dalam *disposable centrifuge tube* IV, setelah itu ditambahkan 450 μ l aquades steril lalu dicampur sampai tercampur sehingga ekstrak tersebut memiliki konsentrasi 5mg/ml.

3.8.3 Tahap Perlakuan Terhadap Media Telur Ayam

- a. Telur ayam kampung yang telah diinkubasi selama 3 hari dalam suhu 37°C diteropong dengan menggunakan senter untuk mengetahui ada tidaknya embrio dan letak ruang udara.
- b. Telur yang sudah mengandung embrio disucihamakan kerabangnya dengan menggunakan alkohol 70%. Kemudian dibuat lubang pada kerabag diatas ruang udara.

- c. Ke dalam telur tersebut diimplantasikan paper disk dan ekstrak polifenol kakao sebanyak 10 μ l dengan beberapa konsentrasi yang telah dibuat, yaitu 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 5 mg/ml. Masing-masing konsentrasi menggunakan 4 telur ayam.
- d. Menutup lubang yang telah dibuat pada telur dengan menggunakan kasa steril dan kertas tisu kemudian direkatkan dengan isolasi sampai rapat.
- e. Setelah diberi perlakuan telur diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 hari. Pada hari ke-3 tutup lubang dibuka dan difiksasi dengan menggunakan methanol dan aseton 1:1 sebanyak 1000 μ l selama 10 menit di lemari pendingin kemudian membrane dikeringkan di dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.
- f. Setelah proses fiksasi membran korio alantois difoto untuk kemudian diamati secara makroskopis.

3.8.4 Tahap Pengamatan

Pengamatan dilakukan secara makroskopis dengan cara menghitung jumlah pembuluh darah baru di 1 daerah yang dekat dengan paper disk dengan ukuran $\pm 1 \times 1,5$ cm. Cabang pembuluh darah yang terakhir muncul adalah pembuluh darah yang dihitung.

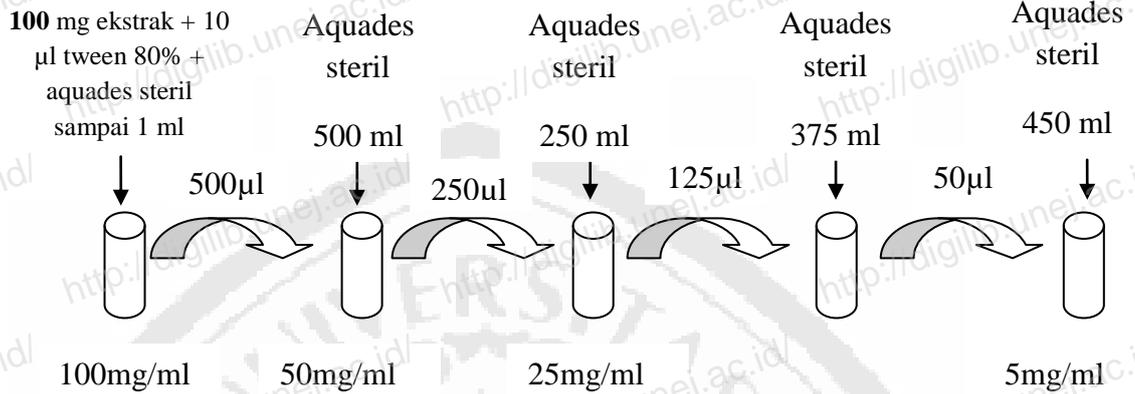
3.8 Analisis Data

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 variansi data homogen atau tidak. Apabila variansi data homogen, maka dilakukan analisis variansi satu arah (*One Way ANOVA*), bila variansi 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.

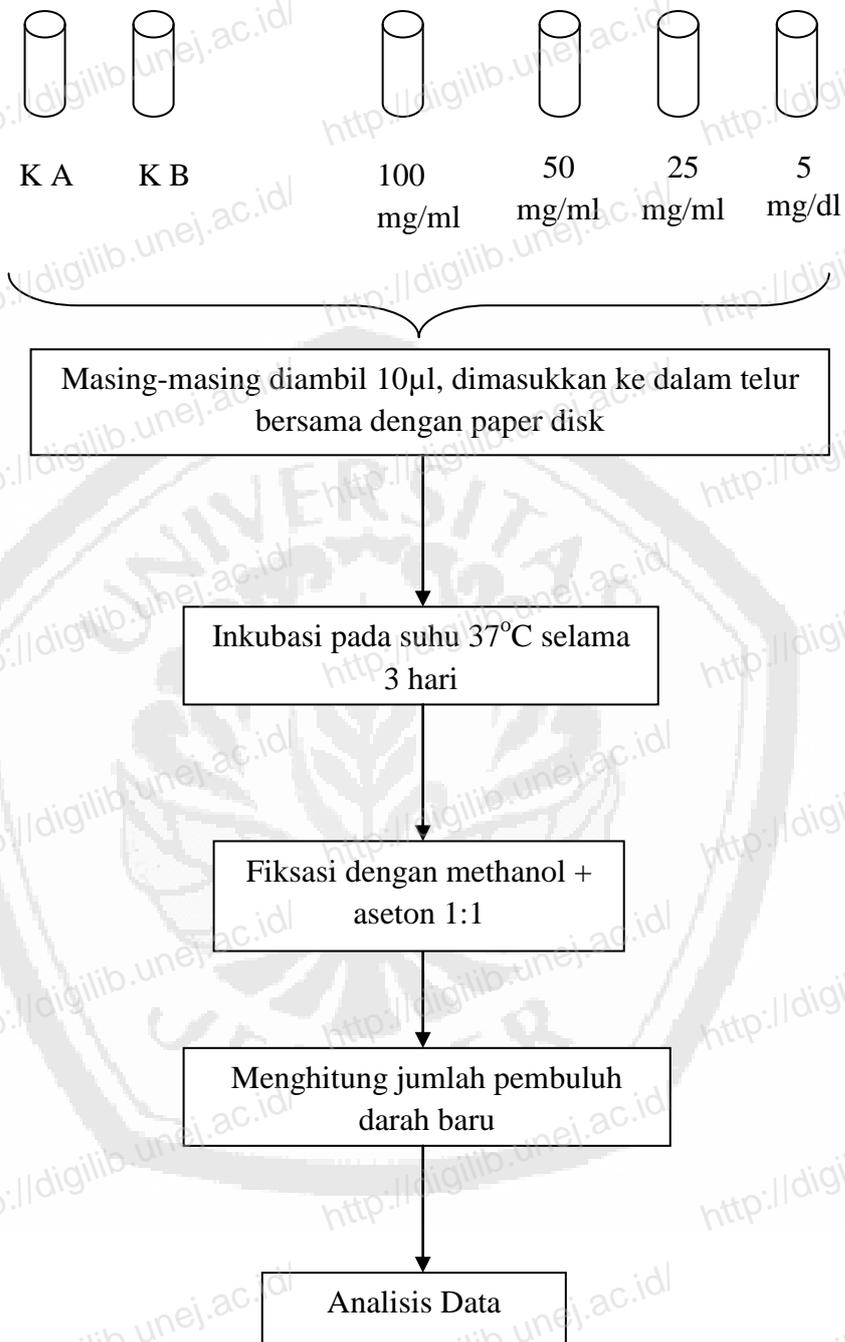
3.10 Alur Penelitian

3.10.1 Pengenceran



Gambar 3.3 Skema pengenceran ekstrak

3.10.2 Alur Penelitian

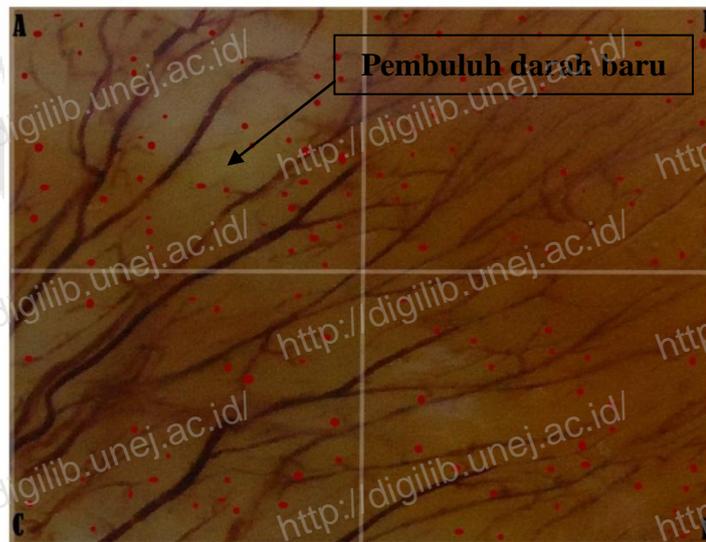


Gambar 3.3 Skema alur penelitian

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

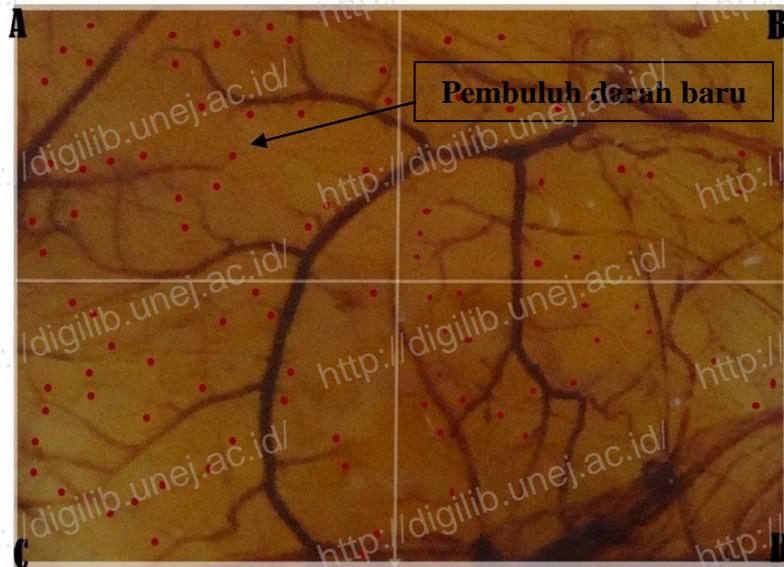
4.1 Hasil Penelitian

Penghitungan jumlah pembuluh darah dilakukan secara manual dengan cara membagi lapang pandang menjadi 4 bagian, yaitu bagian A, B, C, dan D. Selanjutnya dari ke 4 daerah tersebut dihitung cabang pembuluh darah yang masih kecil dan baru. Hasil penghitungan cabang dari masing-masing daerah kemudian dijumlahkan untuk memperoleh total jumlah pembuluh darah pada setiap perlakuan. Penghambatan angiogenesis ditunjukkan pada menurunnya jumlah pembuluh darah baru yang terbentuk. Hasil dari penghitungan jumlah pembuluh darah pada membran korio alantois yang telah diberi perlakuan berupa ekstrak polifenol kakao dalam berbagai konsentrasi dapat, lihat gambar 4.1 – 4.6. Daerah A, B, C, D adalah pembagian dalam penghitungan pembuluh darah baru, hasil didapatkan dari penjumlahan ke-4 daerah tersebut. Titi-titik merah pada gambar menunjukkan pembuluh darah baru yang dihitung.



(A) Daerah pertama; (B) Daerah kedua; (C) Daerah ketiga; (D) Daerah keempat

Gambar 4.1 Membran korio alantois tanpa diberi perlakuan



(A) Daerah pertama; (B) Daerah kedua; (C) Daerah ketiga; (D) Daerah keempat

Gambar 4.2 Membran korio alantois dengan pemberian aquades + tween 80%.



(A) Daerah pertama; (B) Daerah kedua; (C) Daerah ketiga; (D) Daerah keempat

Gambar 4.3 Membran korio alantois dengan pemberian ekstrak polifenol kakao konsentrasi 5 mg/ml.



(A) Daerah pertama; (B) Daerah kedua; (C) Daerah ketiga; (D) Daerah keempat

Gambar 4.4 Membran korio alantois dengan pemberian ekstrak polifenol kakao konsentrasi 25 mg/ml.



1. Daerah pertama; (B) Daerah kedua; (C) Daerah ketiga; (D) Daerah keempat

Gambar 4.5 Membran korio alantois dengan pemberian ekstrak polifenol kakao konsentrasi 50 mg/ml.



2. Daerah pertama; (B) Daerah kedua; (C) Daerah ketiga; (D) Daerah keempat

Gambar 4.6 Membran korio alantois dengan pemberian ekstrak polifenol kakao konsentrasi 100 mg/ml.

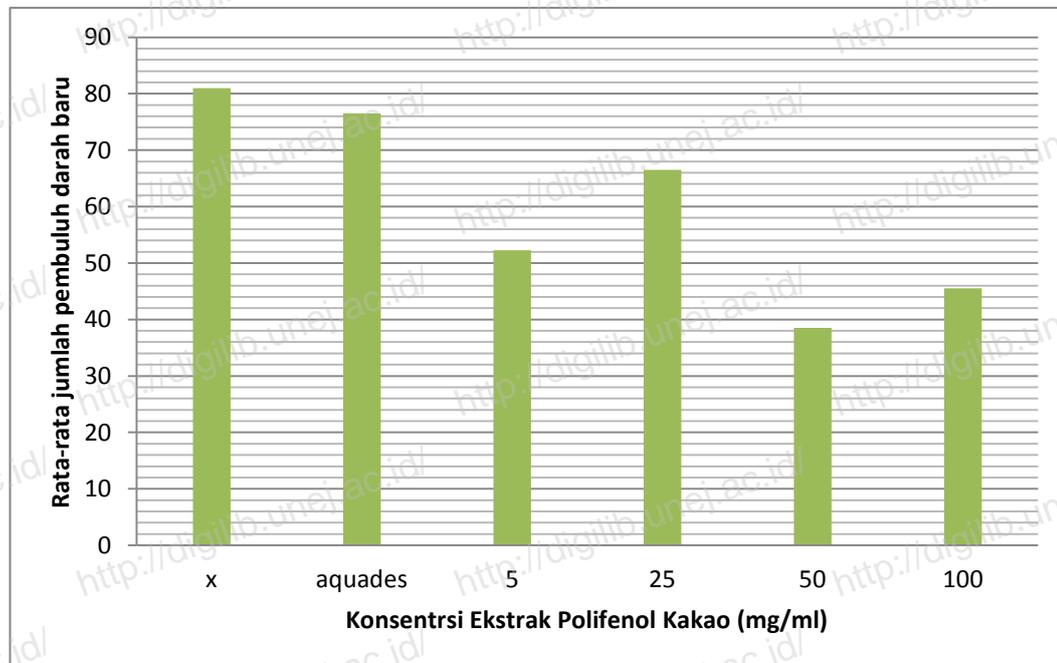
Dari percobaan yang telah dilakukan, hasil penghitungan pada setiap perlakuan dimana setiap perlakuan menggunakan 4 sampel ada dalam tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil penghitungan jumlah pembuluh darah baru ekstrak polifenol biji kakao (*Theobroma cacao*) berbagai konsentrasi.

Konsentrasi mg/ml	Jumlah Pembuluh Darah Baru				Rata-rata
	I	II	III	IV	
100	33	67	49	33	45,5
50	45	41	27	41	38,5
25	61	61	67	77	66,5
5	40	59	40	70	52,25
aquades	43	94	86	83	76.5
Tanpa perlakuan	80	90	71	76	81,0

Dari Tabel 4.1 diketahui bahwa 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. Diagram batang rata-rata

hasil penghitungan jumlah pembuluh darah baru pada membran korio alantois yang diberi ekstrak kakao berbagai konsentrasi dapat dilihat pada Gambar 4.7 berikut ini:



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

4.2 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan analisis data *One Way Anova*. Sebelumnya telah dilakukan uji normalitas data menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov (Lampiran A). 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 (Lampiran B). 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 $p=0,002$ (Lampiran C). 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 (Lampiran D). 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 variable terikat dan X adalah variable bebas. Berdasarkan uji regresi linier (lampiran E) 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.

4.3 Pembahasan

Pembuatan ekstrak polifenol biji kakao dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana, yaitu dengan merendam serbuk simplisata dalam cairan penyari. Cairan penyari yang digunakan dalam metode ini ada 2 yaitu n-heksana dan etanol. Metode maserasi dilakukan dengan cara merendam biji kakao dalam cairan pelarut. Pelarut (cairan penyari) akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel, zat aktif yang terkandung dalam rongga sel akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan di luar sel, maka larutan yang ada di dalam akan didesak keluar hingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dengan di dalam sel (Ningsih *et al.*, 2009).

Pemilihan perendaman dengan n-heksana adalah untuk melarutkan sisa-sisa lemak yang masih ada setelah dilakukan pengepresan sehingga terbentuk bubuk biji kakao yang bebas lemak. Perendaman yang kedua yaitu dengan etanol. Etanol dipilih sebagai cairan penyari karena bahan-bahan penting yang terkandung dalam biji kakao seperti flavonoid dan senyawa lain lebih larut kedalam penyari etanol dibandingkan dengan air sebagai cairan penyari. Zat penting seperti katekin dalam biji kakao juga mudah larut dalam alkohol (etanol) dan flavonoid lebih larut dalam etanol karena etanol bersifat polar.

Kontrol yang digunakan pada penelitian ini adalah membran korio alantois yang tidak diberi perlakuan dan kontrol aquades + tween 80%, karena tanpa perlakuan pembuluh darah akan terbentuk normal. Dalam penelitian ini aquades + tween 80% digunakan sebagai pelarut, sehingga perlakuan kontrol aquades dimaksudkan untuk membuktikan bahwa aquades maupun tween 80% tidak mempunyai efek penghambatan angiogenesis.

Dalam penelitian ini dipilih angiogenesis sebagai parameter yang diuji karena angiogenesis merupakan salah satu upaya sel kanker untuk bertahan hidup dan terus berkembang. Sejak lama sasaran terapi kanker semata-mata adalah mengupayakan kematian sel kanker secara langsung. Namun hal ini ternyata tidak selektif sehingga pendekatan tersebut juga mengakibatkan efek toksik yang cukup bermakna untuk sel normal lainnya, dan bagi penderitanya sendiri secara

menyeluruh. Kesulitan menjadi bertambah dengan kenyataan bahwa mutasi sel kanker dapat senantiasa terjadi sehingga timbul resistensi terhadap pengobatan (Hardjolukito *et al.*, 2010).

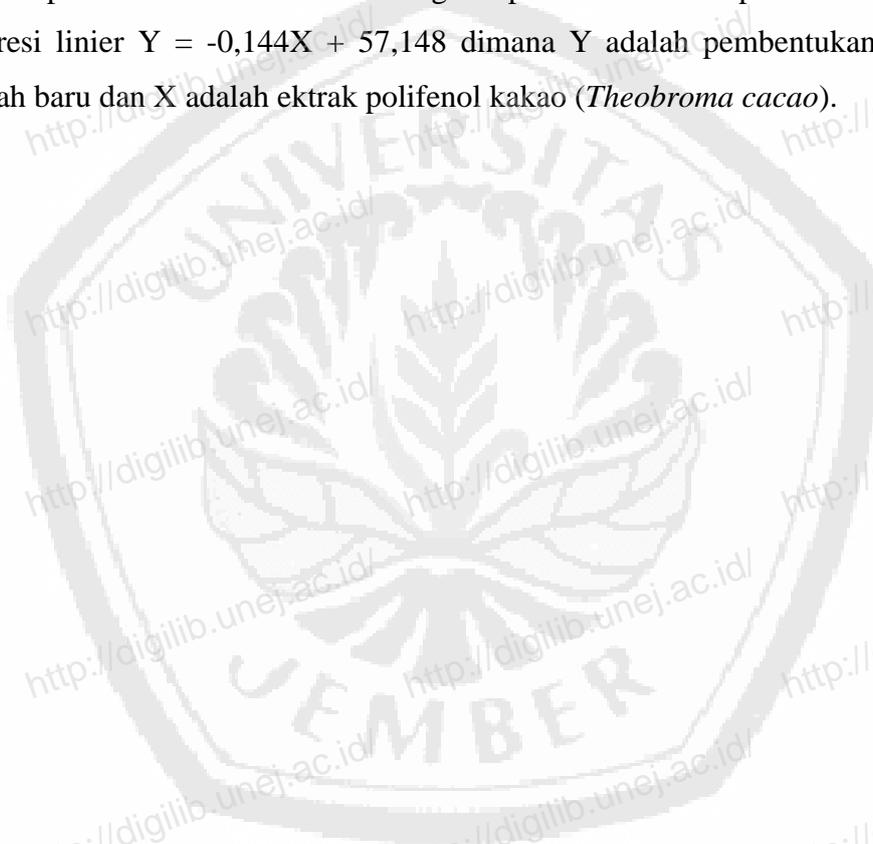
Penghambatan perkembangan sel kanker melalui berbagai zat antiangiogenik diharapkan akan dapat memberikan terapi antikanker yang sifatnya spesifik mematikan sel kanker tanpa memberikan efek buruk bagi organ tubuh lain yang masih sehat. Flavonoid pada polifenol berbagai macam tumbuhan telah diuji mempunyai efek antiangiogenik, salah satunya adalah polifenol pada daun sambung nyawa. Pada daun tersebut polifenol mempunyai daya hambat terhadap angiogenesis yang cukup bermakna (Jenie *et al.*, 2006). Sehingga flavonoid yang terdapat di dalam tanaman kakao diharapkan juga mempunyai efek antiangiogenik. Menurut Kim dan Keeney (dalam Misnawi, 2003), katekin merupakan kandungan flavonoid terbesar pada kakao. Dalam penelitian sebelumnya dilakukan uji inhibisi terhadap enzim matrix metalloproteinase (MMP) oleh katekin yang terdapat pada teh hijau. Dari penelitian tersebut didapatkan hasil yang cukup signifikan. MMP mempunyai fungsi khusus terhadap degradasi matriks ekstra seluler dan sangat berperan dalam proses pembentukan pembuluh darah baru.

Hasil uji dengan *One Way Anova* menyatakan bahwa terdapat perbedaan aktivitas antiangiogenik antara kelompok control dan kelompok perlakuan ekstrak polifenol biji kakao (*Theobroma cacao*). Sedangkan pada uji regresi tidak didapatkan perbedaan aktivitas antiangiogenik yang signifikan antara setiap perbedaan konsentrasi ekstrak pada kelompok perlakuan. Pada uji *Post Hoc multiple comparisons* dengan metode LSD dilakukan perbandingan dengan kontrol membran korio alantois tanpa perlakuan untuk menilai daya hambat angiogenesis secara statistik. Hasil perbandingan pada konsentrasi 5 mg/ml, 50 mg/ml, dan 100 mg/ml memiliki daya hambat yang bermakna secara statistik. Selain itu, efek antiangiogenik pada aquades + tween 80% tidak memiliki perbedaan yang bermakna bila dibandingkan dengan jumlah pembuluh darah baru pada membran korio alantois tanpa perlakuan (Lampiran D).

Berdasarkan uji statistika yang telah diuraikan di atas ekstrak polifenol kakao (*Theobroma cacao*) memiliki efek antiangiogenik. Ekstrak ini menghambat angiogenesis secara tidak langsung, 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 metalloproteinase (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 penetrasian 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*).



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

- a. Ekstrak polifenol kakao (*Theobroma cacao*) memiliki efek antiangiogenik pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam.
- b. Peningkatan dosis pemberian ekstrak polifenol kakao (*Theobroma cacao*) tidak memiliki perubahan efek antiangiogenik yang cukup bermakna pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam.

5.2 Saran

Dari hasil penelitian yang diperoleh, masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai :

- a. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap manfaat kakao sebagai antiangiogenik.
- b. Perlu dilakukan penelitian tentang proses penghambatan pembentukan pembuluh darah menggunakan kakao secara spesifik.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2011. Selaput Ekstraembrio.
<http://www.sith.itb.ac.id/profile1/pdf/perkembangan-hewan/SELAPUT%20EKSTRAEMBRIO.pdf>. [15 November 2011].
- Angiogenesis foundation. 2009. The Angiogenesis Process.
<http://www.angio.org/understanding/process.php>.
- Bachtiar, & Imam. 2003. Reproduksi Seksual Karang Scleractinia: Telaah Pustaka. *Biota*. Vol. 8 (3). 131-134.
- Corwin, E. J. 2007. *Buku Saku Patofisiologi*. Cetakan I. Jakarta: EGC.
- Desen, W. 2011. *Buku Ajar Onkologi Klinis*. Cetakan II. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Doloksaribu. 2011. Isolasi Senyawa Flavonoid dari Daun Harimonting. Universitas Sumatra Utara.
<http://repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/23908/4/Chapter%20II.pdf>.
- Fajriani, Wahid, S., dan Horax, S. 2011. Effect To Topical Application Of Catechin (Green Tea) On The Dynamic *Matrix Metalloproteinases Enzymes* (MMP-2, MMP-8) And Their Spesifik Inhibitor (Timp-1) In Saliva Of Early Childhood.
repository.unhas.ac.id/.../full%20tex%20for%20jakarta%202011.do.
- Farhat. 2009. *Vascular Endothelial Growth Factor pada Karsinoma Nasofaring*. *Majalah Kedokteran Nusantara*. Vol 42(1). 59-65.
- Fatima, N. N. 2012. "Uji Daya Antibakteri Ekstrak Polifenol Biji Kakao (*Theobroma cacao*) Terhadap Pertumbuhan *Escherechia coli* Secara In Vitro." Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Gondhowihardjo, S. 2010. *Basic Science of Oncology: Disregulasi Proliferasi Sel dan Keganasan*. Cetakan I. Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Hardjolukito, E.SR., Cornain, S., dan Hernowo, B.S. 2010. *Basic Science of Oncology: Angiogenesis*. Cetakan I. Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Hastuti. 2010. "Pemanfaatan Ekstrak Polifenol Kulit Buah dan Biji Kakao Sebagai Senyawa Penghambat Pertumbuhan Bakteri (*Bacillus subtilis* dan *Escherechia coli*).” Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Fakultas Teknik Hasil Pertanian Universitas Jember.

International Union Against Cancer. 2009. 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>.

Jenie, R.I., Meiyanto, E., dan Muwarti, 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.

Malik, G. S. 2010. *Basic Science of Oncology: Disregulasi Apoptosis Sel Kanker*. Cetakan I. Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Misnawi. 2003. "Influence of Cocoa Polyphenols and Enzyme Reactivation on The Flavor Development of Unfermented and Underfermented Cocoa Beans." Tidak Diterbitkan. Thesis. Malaysia : Putra Malaysia University.

Misnawi. 2010. *Pengolahan Produk Primer dan Sekunder Kakao*. Edisi 4. Jember: Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia.

Nijveld, Nood, Hoorn, Boelens, Norren, dan Leeuwen. 2001. Flavonoids: A Review of Probable Mechanisms of Action and Potential Applications. <http://ajcn.nutrition.org/content/74/4/418.full>. [14Mei 2001].

Ningsih, I., Nuri, P., dan Amrun, M. 2009. *Buku Petunjuk Praktikum Fitokimia*. Edisi 4. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Paembong, A. 2012. "Mempelajari Perubahan Kandungan Polifenol Bijikakao (*Theobroma Cacao L*) dari Hasil Fermentasi yang Diberi Perlakuan Larutan Kapur." Tidak Diterbitkan. Skripsi. Makassar : Fakultas Pertanian Universitas Hasanuddin.

Pandya, N. M., Dhalla. N. S., dan Santani. D. D., 2006. Angiogenesis: a new target for future therapy. *Vasc. Pharmacol*. 44(5): 265-274.

Piasiska, H. 2011. "Tampilan Pulasan Imunohistokimia *Matrix Metalloproteinase-9* (Mmp-9) Pada *Undifferentiated Carcinoma* Nasofaring Tipe Regaud Dan Tipe Schmincke." Tidak Diterbitkan. Thesis. Medan : Fakultas Kedokteran USU / RSUP H.Adam Malik.

- Puspitasari, D. 2012. "Ekspresi Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) pada Carcinoma Nasofaring di RSUD H.Adam Malik Medan." Tidak Diterbitkan. Tesis. Medan: Fakultas Kedokteran Universitas Sumatra Utara.
- 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>.
- Robinson. 1995. Mahkota Dewa: Tinjauan Pustaka. http://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/17004/G09rha-4_BAB%20II%20Tinjauan%20Pustaka.pdf?sequence=6.
- Setiadevi, S. 2010. "Karakteristik Ekstra Polifenol Biji Kakao Non Fermented dari Berbagai Macam Metode Ekstraksi." Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Fakultas Teknik Pertanian Universitas Jember.
- Stauth, D. 2007. Studies force new view on biology of flavonoids. http://www.academia.edu/1905546/Antioxidant_antimicrobial_and_antive_rototoxic_potentials_of_extracts_of_Curtisia_dentata.
- Sukardja, I. D. G. *Onkologi Klinik*. Edisi 2. Surabaya : Airlangga University Press.
- Supriyono, T. 2008. "Kandungan beta karoten, polifenol total dan aktivitas merantas radikal bebas kefir susu kacang hijau (*vigna radiata*) oleh pengaruh jumlah starter (*lactobacillus bulgaricus* dan *candida kefir*) dan konsentrasi glukosa." Tidak Diterbitkan. Tesis. Semarang : Universitas Diponegoro.
- Tan, I. M. 2010. Basic Science of oncology *Basic Science of Oncology: Hormon dan Enzim Pada Kanker*. Cetakan I. Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Wahyudi. 2009. *Panduan Lengkap Kakao Managemen Agribisnis Dari Hulu hingga Hilir*. Cetakan ke-2. Jakarta: Penebar Swadaya.
- YKI. 2012. Tentang Kanker. <http://yayasankankerindonesia.org/search/tentang+kanker>.

LAMPIRAN A. UJI NORMALITAS DATA

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Data
N		24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	60.0417
	Std. Deviation	20.38857
Most Extreme Differences	Absolute	.145
	Positive	.145
	Negative	-.092
Kolmogorov-Smirnov Z		.709
Asymp. Sig. (2-tailed)		.697

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

LAMPIRAN B. UJI HOMOGENITAS

Test of Homogeneity of Variances

Data

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.865	5	18	.151

LAMPIRAN C. UJI ONE WAY ANOVA

Oneway

Descriptives

Data

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Aquades	4	76.5000	22.81082	11.40541	40.2029	112.7971
X	4	81.0000	8.98146	4.49073	66.7085	95.2915
5.00	4	52.2500	14.84082	7.42041	28.6349	75.8651
25.00	4	66.5000	7.54983	3.77492	54.4865	78.5135
50.00	4	38.5000	7.89515	3.94757	25.9371	51.0629
100.00	4	45.5000	16.19671	8.09835	19.7274	71.2726
Total	24	60.0417	20.38857	4.16180	51.4323	68.6510

Descriptives

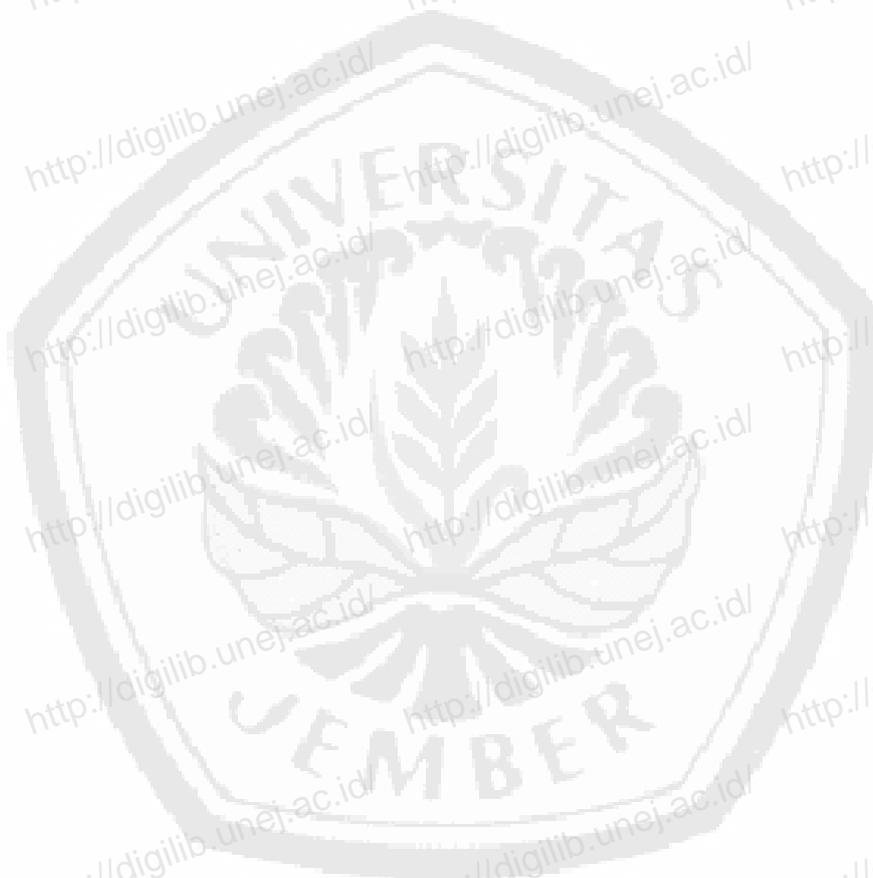
Data

	Minimum	Maximum
Aquades	43.00	94.00
X	71.00	90.00
5.00	40.00	70.00
25.00	61.00	77.00
50.00	27.00	45.00
100.00	33.00	67.00
Total	27.00	94.00

ANOVA

Data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5952.208	5	1190.442	5.938	.002
Within Groups	3608.750	18	200.486		
Total	9560.958	23			



LAMPIRAN D. Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable:Data

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.
LSD	Aquades	X	-4.50000	10.01215	.658
		5.00	24.25000*	10.01215	.026
		25.00	10.00000	10.01215	.331
		50.00	38.00000*	10.01215	.001
		100.00	31.00000*	10.01215	.006
	X	Aquades	4.50000	10.01215	.658
		5.00	28.75000*	10.01215	.010
		25.00	14.50000	10.01215	.165
		50.00	42.50000*	10.01215	.000
		100.00	35.50000*	10.01215	.002
5.00	Aquades	-24.25000*	10.01215	.026	
	X	-28.75000*	10.01215	.010	
	25.00	-14.25000	10.01215	.172	
	50.00	13.75000	10.01215	.187	
	100.00	6.75000	10.01215	.509	
25.00	Aquades	-10.00000	10.01215	.331	
	X	-14.50000	10.01215	.165	
	5.00	14.25000	10.01215	.172	
	50.00	28.00000*	10.01215	.012	
	100.00	21.00000	10.01215	.050	
50.00	Aquades	-38.00000*	10.01215	.001	
	X	-42.50000*	10.01215	.000	

	5.00	-13.75000	10.01215	.187
	25.00	-28.00000*	10.01215	.012
	100.00	-7.00000	10.01215	.493
100.00	Aquades	-31.00000*	10.01215	.006
	X	-35.50000*	10.01215	.002
	5.00	-6.75000	10.01215	.509
	25.00	-21.00000	10.01215	.050
	50.00	7.00000	10.01215	.493

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Multiple Comparisons

Dependent Variable:Data

	(I)	(J)	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
LSD	Perlakuan	Aquades		
		X	-25.5347	16.5347
		5.00	3.2153	45.2847
		25.00	-11.0347	31.0347
		50.00	16.9653	59.0347
	100.00	9.9653	52.0347	
	X	Aquades	-16.5347	25.5347
		5.00	7.7153	49.7847
		25.00	-6.5347	35.5347
		50.00	21.4653	63.5347
100.00		14.4653	56.5347	
5.00	Aquades	-45.2847	-3.2153	
	X	-49.7847	-7.7153	
	25.00	-35.2847	6.7847	
	50.00	-7.2847	34.7847	
	100.00	-14.2847	27.7847	
25.00	Aquades	-31.0347	11.0347	
	X	-35.5347	6.5347	

	5.00	-6.7847	35.2847
	50.00	6.9653	49.0347
	100.00	-.0347	42.0347
50.00	Aquades	-59.0347	-16.9653
	X	-63.5347	-21.4653
	5.00	-34.7847	7.2847
	25.00	-49.0347	-6.9653
	100.00	-28.0347	14.0347
100.00	Aquades	-52.0347	-9.9653
	X	-56.5347	-14.4653
	5.00	-27.7847	14.2847
	25.00	-42.0347	.0347
	50.00	-14.0347	28.0347

Homogeneous Subsets

Data

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a 50.00	4	38.5000		
100.00	4	45.5000	45.5000	
5.00	4	52.2500	52.2500	
25.00	4		66.5000	66.5000
Aquades	4			76.5000
X	4			81.0000
Sig.		.210	.061	.187

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

LAMPIRAN E. Uji Regresi Linier Regression

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.493 ^a	.243	-.135	12.72473

a. Predictors: (Constant), Konsentrasi

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	104.084	1	104.084	.643	.507 ^a
	Residual	323.838	2	161.919		
	Total	427.922	3			

a. Predictors: (Constant), Konsentrasi

b. Dependent Variable: Jumlah Cabang

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	57.148	10.267		5.566	.031
	Konsentrasi	-.144	.179	-.493	-.802	.507

a. Dependent Variable: Jumlah Cabang