

Efek antiangiogenik ekstrak etanolik daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam

Antiangiogenic effect of sambung nyawa leaves (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) etanolic extract on chick embryo chorioallantoic membrane (CAM)

Riris Istighfari Jenie, Edy Meiyanto dan Retno Murwanti

Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Abstrak

Salah satu strategi penghambatan perkembangan kanker adalah dengan menghambat proses angiogenesis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antiangiogenesis ekstrak etanolik daun *Gynura procumbens* (Lour.) Merr (Sambung Nyawa) menggunakan model *chick embryo chorioallantoic membrane* (CAM). CAM telur ayam berembrio umur 8-9 hari diberi perlakuan bFGF (induktor angiogenesis) dan ekstrak etanolik daun *G.procumbens* kemudian diinkubasi selama 3 hari untuk selanjutnya diamati respon angiogenesisnya.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan didapatkan hasil bahwa ekstrak etanolik daun *G.procumbens* mampu menghambat angiogenesis pada CAM sebanding dengan dosis ekstrak yang dicobakan. Respon angiogenesis untuk dosis 10,20,40,80 ug masing-masing secara berurutan adalah sebesar (dalam %) $82,32 \pm 6,33$; $68,38 \pm 6,24$; $56,48 \pm 11,61$ dan $41,43 \pm 7,46$ ($p < 0,05$). Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak etanolik daun tanaman Sambung Nyawa memiliki efek antiangiogenik.

Kata kunci: antiangiogenesis, CAM, *G.procumbens*.

Abstract

Antiangiogenesis (inhibition of new blood vessels formation) has become a strategy to inhibit cancer development lack of nutrition and oxygen supply. The aim of the present research is to investigate antiangiogenesis effect of ethanolic extract of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. leaves *in situ* using chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). Eight to 9 days old fertilized chicken eggs were treated with b-FGF (angiogenesis inductor) and extracts. Eggs were then incubated for 3 days in order to observe its angiogenesis response (new blood vessels converged toward the implant).

The results showed that the ethanolic extract of *G.procumbens* could inhibit angiogenesis in a dose-dependent manner. Doses 10, 20, 40, 80 ug gave angiogenesis response of (in percent) 82.32 ± 6.33 ; 68.38 ± 6.24 ; 56.48 ± 11.61 ; 41.43 ± 7.46 ($p < 0.05$), respectively. These results indicate a potential antiangiogenic effect of the extract.

Key words: antiangiogenic, CAM, *G.procumbens*.

Pendahuluan

Untuk dapat tumbuh dan berkembang, kanker membutuhkan serangkaian proses yang

disebut dengan karsinogenesis sehingga memiliki keistimewaan-keistimewaan seperti peningkatan mobilitas dan angiogenesis

(Schneider, 1997). Angiogenesis atau neovaskularisasi merupakan pertumbuhan pembuluh darah baru pada jaringan tubuh, sehingga memungkinkan sel kanker mendapatkan suplai nutrisi dan oksigen (Matter, 2001). Diduga bahwa apabila ada agen kimia yang mampu menghambat neovaskularisasi, maka agen kimia tersebut berpotensi besar dalam terapi pengobatan berbagai penyakit, termasuk kanker (Ribatti *et al.*, 1997). Dari sekian banyak faktor angiogenik yang telah berhasil diidentifikasi, diketahui bahwa *basic fibroblast growth factor* (bFGF) merupakan salah satu faktor angiogenik utama yang berperan dalam angiogenesis (Ribatti, 1999).

Ekstrak etanolik daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) telah diteliti efeknya sebagai antikanker. Sugiyanto, *et al.* (2003) melaporkan adanya efek penghambatan karsinogenitas benzo(a)piren oleh ekstrak etanolik tanaman *G.procumbens* pada pertumbuhan tumor paru mencit. Proses penghambatan ini memiliki beberapa kemungkinan mekanisme yaitu (1) menghambat proses aktivasi karsinogen karena adanya senyawa fenolik yang terkandung di dalamnya, (2) menghambat proliferasi sel sehingga mampu menghambat perkembangan tumor setelah inisiasi melalui *cell cycle arrest*. Kedua mekanisme di atas diduga karena adanya senyawa fenolik yang terkandung di dalam preparat tradisional tanaman tersebut, seperti yang dilaporkan oleh Singh (2002) dimana pemberian *silibinin*, senyawa aktif dari flavonoid *silymarin*, mampu mereduksi volume dan berat tumor prostat pada mencit. Kemungkinan lain adalah (3) senyawa dalam preparat daun Sambung Nyawa mampu menghambat angiogenesis. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan terhadap beberapa senyawa lain yang mampu menghambat angiogenesis seperti halnya *quercetin*, *resveratrol*, *silymarin*, *epigallocatechin gallate* (Igura *et al.*, 2001; Tosetti *et al.*, 2002). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek tanaman *G.procumbens* terhadap penghambatan angiogenesis pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam yang diinduksi bFGF.

Metodologi

Bahan

Ekstrak etanolik daun Sambung Nyawa

(*G.procumbens*) diperoleh dengan jalan mengekstraksi simplisia kering daun *G.procumbens* yang diperoleh dari daerah Ngaglik, Sleman, Jogjakarta dengan etanol 80%. Ekstrak etanol ini kemudian dilarutkan dengan *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) ketika akan diujikan. Induktor angiogenesis yang digunakan adalah *recombinant human* bFGF 1ng/ μ l (Wako-Japan No.kat 067.0431). Membran korio alantois (CAM) embrio ayam berasal dari telur ayam SPF berumur 8 atau 9 hari (dalam kondisi terinkubasi), dibeli di BPPV, Wates, Jogjakarta. Bahan kimia yang lain adalah larutan buffer Tris-HCl 10mM pH 7,5; larutan antiseptik, etanol 70%; pengawet membran CAM, formalin 10%; aqua steril (Plabottle, Otsuka-Indonesia).

Ekstraksi

Serbuk daun diekstraksi menggunakan etanol 80% dengan alat *soxhlet*. Untuk setiap 30 g serbuk digunakan 150 ml etanol 80%. Setelah cairan penyari jernih, maka proses ekstraksi dihentikan, selanjutnya ekstrak etanol diuapkan menggunakan *water-bath* dan kipas angin pada suhu tidak lebih dari 60°C untuk menghilangkan cairan penyari (etanol) hingga diperoleh ekstrak kental. Dari 300 gram serbuk, didapatkan 27,36 gram ekstrak kental, sehingga diperoleh rendemen sebesar 9,12%.

Uji daya hambat angiogenesis

Telur ayam berembrio yang dipakai berumur 8-9 hari. bFGF dan ekstrak diimplantasi ke dalam membran korio alantois melalui lubang pada ruang udara yang telah dipindahkan di atas posisi embrio. Telur dibagi dalam 7 kelompok (masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari 5 telur). Kelompok A adalah telur dengan implantasi *paper disc*, sebagai kontrol *paper disc*. Kelompok B adalah telur dengan implantasi *paper disc* termuat bFGF 30 ng (telur terinduksi), sebagai kelompok kontrol bFGF. Kelompok C, kelompok kontrol bFGF+pelarut, adalah telur dengan implantasi *paper disc* termuat bFGF 30 ng+pelarut (DMSO 0,8 %) sebanyak 200 μ l. Kelompok D, E, F dan G merupakan telur yang digunakan untuk melihat efek penghambatan ekstrak etanol daun *G.procumbens* terhadap angiogenesis CAM. Telur pada kelompok ini diberi implantasi *paper disc* termuat bFGF 30ng+ekstrak etanol daun *G.procumbens* dengan dosis berturut-turut 10 μ g, 20 μ g, 40 μ g dan 80 μ g.

Setelah diberi perlakuan, kemudian telur diinkubasi pada suhu 39°C dan kelembaban relatif 60% selama 3 hari atau 72 jam (Ribatti *et al.*, 1997). Pada hari ke-3 inkubasi telur (umur 12 hari) dibuka dan membran korio alantois yang melekat pada cangkang diamati secara makroskopik dan mikroskopik (pencetakan HE).

Cara analisis

Evaluasi uji antiangiogenik secara makroskopik dilakukan dengan mengamati respon angiogenesis hospes secara deskriptif, dan dikuantifikasi dengan menghitung jumlah pembuluh darah baru pada *paper disc* (termuati bFGF dan ekstrak etanol daun Sambung Nyawa) maupun di sekeliling *paper disc* tersebut (berpola radial). Hasil kuantifikasi kemudian dianalisis statistika dengan metode Mann-Whitney dan Kruskal Wallis.

Hasil Dan Pembahasan

Induksi angiogenesis CAM oleh bFGF

Sebagaimana yang telah diketahui bahwa preparat tradisional tanaman *G.procumbens* mampu menghambat karsinogenitas benzo(a)-piren (Sugiyanto, 2003). Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun *G.procumbens* terhadap angiogenesis pada CAM embrio ayam yang diinduksi bFGF. Pengamatan makroskopik maupun mikroskopik terhadap CAM kelompok A dan C (Gambar 1 dan 2) menunjukkan bahwa baik *paper disc* maupun DMSO tidak mempengaruhi angiogenesis CAM sehingga dapat digunakan sebagai pembawa dan kosolven dalam metode ini. Selain itu dilakukan pula orientasi untuk memastikan bahwa bFGF mampu menginduksi angiogenesis pada CAM. Berdasarkan pengamatan terhadap kelompok B tampak jelas bahwa pemberian bFGF menginduksi terjadinya angiogenesis pada CAM, pembuluh darah baru terbentuk dengan pola radial menuju ke arah *paper disc* yang dimuati bFGF (Gambar 1 dan 2).

Tanpa diberi dari luarpun, sebenarnya bFGF telah ada di membran korio alantoik dimana protein ini berperan penting pada pertumbuhan pembuluh darah selama perkembangan embrio ayam (Ribatti *et al.*, 1999). Pemberian bFGF pada penelitian ini dimaksudkan untuk menginduksi terjadinya angiogenesis, sebagaimana yang terjadi pada keadaan kanker, sehingga pengamatan efek antiangiogenesis ekstrak etanolik daun *G.procumbens* lebih jelas dan kemungkinan mekanismenya lebih terarah.

Efek ekstrak etanolik daun *G.procumbens* pada CAM diinduksi bFGF

Penelitian ini menunjukkan hasil bahwa ekstrak etanolik daun *G.procumbens* menghambat

angiogenesis pada CAM embrio ayam secara signifikan serta memperlihatkan adanya efek antiangiogenesis bergantung pada dosis, efek antiangiogenesis pada CAM meningkat seiring kenaikan dosis ekstrak etanolik daun *G.procumbens* yang diujikan. Pembuluh darah baru yang terbentuk semakin berkurang, baik pada *paper disc* maupun daerah di sekelilingnya. *Paper disc*, yang diimplankan pada CAM, dengan dosis ekstrak etanolik paling besar yang diujikan dalam penelitian ini (80 μ g) terlihat relatif lebih 'bersih' dibandingkan dengan kelompok uji yang lain (Gambar 1). Kuantifikasi respon angiogenesis kelompok uji direlatifkan terhadap respon angiogenesis rata-rata kelompok kontrol bFGF+pelarut (Tabel dan Gambar 3).

Tabel Respon angiogenesis kelompok kontrol dan uji

Kelompok perlakuan	X \pm SD(%)
Kontrol bFGF+pelarut	100 \pm 13,30
bFGF+ekst.etn. dosis 10 μ g	82,32 \pm 6,33 ^{a,b}
bFGF+ekst.etn. dosis 20 μ g	68,38 \pm 6,24 ^{a,c}
bFGF+ekst.etn. dosis 40 μ g	56,48 \pm 11,61 ^{a,c}
bFGF+ekst.etn. dosis 80 μ g	41,43 \pm 7,46 ^{a,b}

Keterangan:

Ekst. etn. : ekstrak etanolik daun dewa

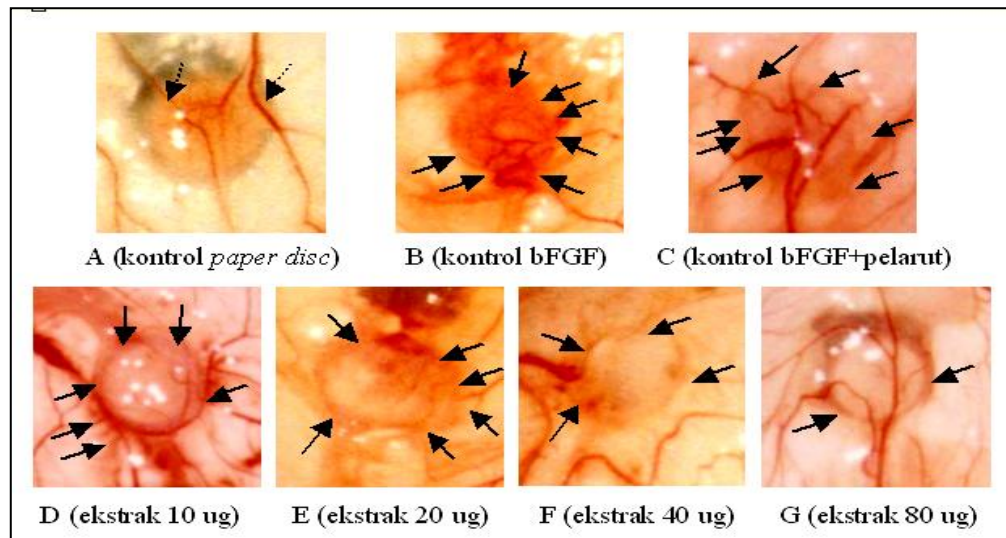
a: berbeda bermakna terhadap kelompok kontrol

b: berbeda bermakna terhadap kelompok uji yang lain

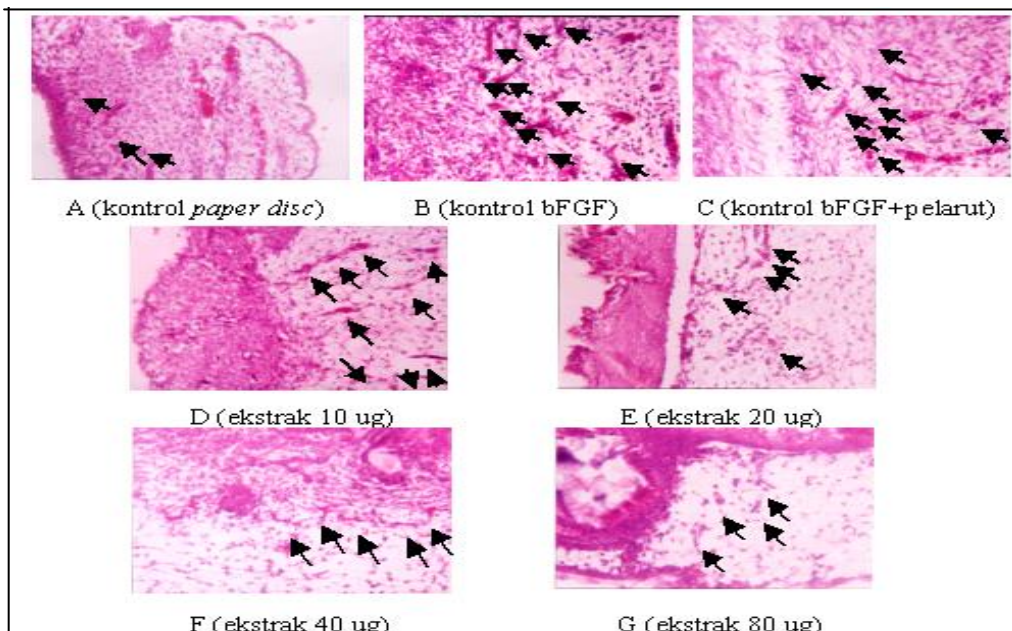
c: tidak berbeda bermakna terhadap kelompok uji yang lain

Data mewakili lima sampel pada masing-masing kelompok perlakuan

Berdasarkan hasil pengamatan makroskopik maupun mikroskopik tampak bahwa respon angiogenesis pada CAM terinduksi bFGF semakin berkurang atau penghambatan angiogenesis pada CAM meningkat dengan kenaikan dosis ekstrak etanolik daun *G.procumbens* yang dicobakan. Respon angiogenesis terendah dalam penelitian ini adalah pada pemberian dosis ekstrak etanolik daun *G.procumbens* paling besar, 80 μ g, yaitu sebesar 41,43 \pm 7,46% ($p < 0,05$) dan respon angiogenesis tertinggi ditunjukkan pada pemberian dosis ekstrak etanolik daun *G.procumbens* terkecil, 10 μ g, yaitu 82,32 \pm 6,33% ($p < 0,05$). Respon angiogenesis seluruh kelompok uji menunjukkan perbedaan yang bermakna terhadap kelompok kontrol bFGF+pelarut DMSO 0,8%. Kecuali antara kelompok dosis 20 μ g dan dosis 40 μ g, respon angiogenesis antar



Gambar 1. Pengamatan makroskopik respon angiogenesis kelompok kontrol dan uji. CAM dari embrio ayam berumur 8 atau 9 hari diberi perlakuan seperti yang diuraikan pada metode (secara aseptis), kemudian diinkubasi selama 3 hari untuk selanjutnya dikeluarkan isinya dan dilakukan pengamatan terhadap CAM menggunakan lup. Pembuluh darah baru yang terbentuk dikuantifikasi dan direlatifkan terhadap kelompok kontrol bFGF+pelarut. Data yang ditampilkan mewakili lima sampel pada masing-masing kelompok perlakuan. (→) menunjukkan pembuluh darah baru yang terbentuk di sekeliling *paper disc* dengan pola radial. (.....▶) menunjukkan percabangan pembuluh darah asal yang melewati *paper disc*.



Gambar 2. Pengamatan mikroskopik respon angiogenesis kelompok kontrol dan uji. CAM dari embrio ayam berumur 8 atau 9 hari diberi perlakuan seperti yang diuraikan pada metode (secara aseptis), kemudian diinkubasi selama 3 hari untuk selanjutnya dikeluarkan isinya. CAM dibuat menjadi preparat histopatologi kemudian dilakukan pengamatan mikroskopik menggunakan pengecatan HE; pada perbesaran 20x. Data yang ditampilkan mewakili lima sampel pada masing-masing kelompok perlakuan. (→) menunjukkan pembuluh darah baru yang terbentuk di sekeliling *paper disc*

kelompok uji menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$).

Meskipun belum dapat dipastikan, namun pemberian bFGF sebagai induktor dapat memberikan sedikit gambaran mengenai kemungkinan mekanisme aksi penghambatannya. Berbagai zat kimia yang mungkin terkandung di dalam ekstrak etanolik daun *G.procumbens* diantaranya flavonoid dan polifenol diduga berperan dalam kemampuan menghambat angiogenesis ekstrak tersebut. Beberapa penelitian mengenai flavonoid merekomendasikan kemungkinan aksinya sebagai senyawa kimia yang mampu menghambat kanker dan diantaranya melalui penghambatan angiogenesis.

Flavonoid tersebut, diantaranya *resveratrol* dan *quercetin* pada kadar 100 μM mampu menghambat aspek-aspek angiogenesis (proliferasi, migrasi sel endotelial dan pembentukan pipa pembuluh darah) (Igura *et al.*, 2001). *Silymarin*, suatu flavonoid antioksidan, sedang dikembangkan sebagai agen inhibitor terhadap enzim COX-2 (Tosetti *et al.*, 2002). Senyawa ini menurunkan jumlah sel HUVEC (sel endotelial) pada kadar 50 $\mu\text{g/ml}$. Masferrer *et al.* (2000) melaporkan bahwa angiogenesis diblok oleh inhibitor COX-2 yang diinduksi b-FGF. COX-2 berperan pada proses angiogenesis melalui sintesis prostaglandin (PG). PG berperan penting di dalam induksi VEGF. Oleh karena itu penghambatan aktivitas COX-2 akan berakibat pada penghambatan angiogenesis (Masferrer *et al.*, 2000). Kandungan dalam ekstrak etanolik daun *G.procumbens* mungkin bertindak sebagai penghambat COX-2, memblok produksi PG, sehingga dapat mencegah pembentukan endotelial kapiler dan proliferasinya.

Terdapat kemungkinan bahwa di dalam ekstrak etanolik daun *G.procumbens* terkandung senyawa yang bertindak sebagai inhibitor

angiogenesis. Hal ini antara lain dilakukan melalui pengeblokan terhadap reseptor VEGF atau reseptor bFGF sehingga tidak dapat berikatan dengan faktor-faktor pertumbuhan tersebut (Kerbel dan Folkman, 2002) atau menghambat *matrix metalloproteinases* (MMPs), enzim proteinase yang mengkatalisis rusaknya matriks ekstraselular, sehingga sel-sel endotelial mampu migrasi ke jaringan sekitarnya, membentuk pembuluh darah baru (Keshet dan Ben-Sasson, 1999). *Epigallocatechin gallate* (EGCG), flavonoid dari teh hijau, pada kadar 4mM berefek antiangiogenesis melalui mekanisme penghambatan MMP (Tosetti *et al.*, 2002). Berdasarkan fakta ini maka sangat mungkin flavonoid dalam ekstrak etanolik *G.procumbens* juga memiliki mekanisme aksi penghambatan angiogenesis demikian.

Pada penelitian ini ekstrak *G.procumbens* mampu menghambat angiogenesis pada kadar 20 μg . Apabila dibandingkan dengan senyawa fenolik lain yang telah diuji potensinya sebagai inhibitor angiogenesis hasil tersebut mengindikasikan bahwa ekstrak *G.procumbens* menunjukkan potensi yang cukup kuat. Penelitian ini telah memberikan wawasan baru mengenai mekanisme antikanker *G.procumbens* yang perlu ditelusuri lebih lanjut.

Kesimpulan

Ekstrak etanolik daun *G.procumbens* menurunkan respon angiogenesis pada CAM embrio ayam. Efek antiangiogeniknya sebanding dengan besar dosis yang digunakan. Dosis terendah 10 μg menunjukkan penghambatan sebesar $17,68 \pm 6,33\%$ dan dosis tertinggi 80 μg sebesar $58,57 \pm 7,46\%$ ($p < 0,05$).

Ucapan Terima kasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Project Grant QUE Farmasi 2002/2003..

Daftar Pustaka

- Igura, K., Ohta T., Kuroda Y., and Kaji K., 2001, Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro, *Cancer Lett*, 171 (1): 11-6.
- Kerbel, R., and Folkman, J., 2002, Clinical Translation of Angiogenesis Inhibitors, *Nat. Rev.*, 2: 727-739.
- Keshet, E., and Ben-Sasson, S. A., 1999, Anticancer drug targets:approaching angiogenesis, *J. Clin. Invest.*, Vol.104, No.11, 1497-1501.
- King, R.J.B., 2000, *Cancer Biology*, Ed. 2, Pearson Education, England.

- Masferrer, J.L, and Leahy K.M, et al, 2000, Antiangiogenic and Antitumor Activities of Cyclooxygenase-2 Inhibitors, *Cancer Res*, 60:1306-1311.
- Matter, A., 2001, Tumor angiogenesis as a therapeutic target, *Drug Discovery Today*, Vol 6, No. 19, hal 1005-1020.
- Ribatti, D., Gualandris, A., Bastaki, M., Vacca, A., Iurlaro, M., Roncali, L., and Presta, M., 1997, New Model for the Study of Angiogenesis and Antiangiogenesis in the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane: The Gelatin Sponge/Chorioallantoic Membrane Assay, *Journal of Vascular Research*, 34:455-463.
- Ribatti, D., Leali, D., Vacca, A., Giuliani, R., Gualandris, A., Roncali, L., Nalli, M.L., and Presta, M., 1999, In Vivo Angiogenic Activity of Urokinase; Role of Endogenous Fibroblast Growth Factor-2, *J. Cell. Sci.*, 112, 4213-4221.
- Schneider, K.A., 1997, Cancer Genetics, *Encyclopedia of Human Biology*, Vol. 2, Hal 311-320.
- Singh, R.P., Dhanalakshmi, S., Tyagi, A.K., Chan, D.C.F., Agarwal, C., and Agarwal, R., 2002, Dietary Feeding of Silibinin Inhibits Advance Human Prostate Carcinoma Growth in Athymic Nude Mice and Increases Plasma Insulin-like Growth Factorbinding Protein-3 Levels, *CANCER RESEARCH*, 62, 3063–3069.
- Sugiyanto, Sudarto, B., Meiyanto, E., Nugroho, A.E., and Jenie, U.A., 2003, Aktivitas antikarsinogenik senyawa yang berasal dari tumbuhan, *Majalah Farmasi Indonesia*, 14(4):216-225.
- Tosetti, F., Ferrari, N., de Flora S., and Albin A., 2002, 'Angioprevention': angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents, *FASEB J.*, 16:2-14.