

**ANGIOGENESIS PADA MEMBRAN KORIO ALANTOIS
EMBRIO AYAM AKIBAT IMPLANTASI TUMOR PAYUDARA
TIKUS (*Rattus novergicus* L.) DAN PERLAKUAN EKSTRAK
DAUN BENALU TEH (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser)**

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat sarjana S2

Program Studi Biologi
Jurusan Ilmu-Ilmu Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Diajukan oleh :

EMA DEWANTI
20318/I-2/519/03

Kepada :

**SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS GADJAH MADA
YOGYAKARTA
2006**

Tesis
ANGIOGENESIS PADA MEMBRAN KORIO ALANTOIS
EMBRIO AYAM AKIBAT IMPLANTASI TUMOR PAYUDARA
TIKUS (*Rattus norvegicus* L.) DAN PERLAKUAN EKSTRAK
DAUN BENALU TEH (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser)

dipersiapkan dan disusun oleh

Ema Dewanti

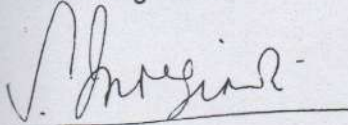
20318/I-2/519/03

telah dipertahankan di depan Dewan Penguji

pada tanggal **5 September 2006**

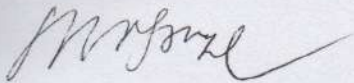
Susunan Dewan Penguji

Pembimbing Utama



Dr. S.M. Isoegianti R.

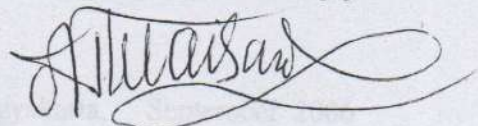
Pembimbing Pendamping I



Dr. Nyoman Puniawati S., SU.

Pembimbing Pendamping II

Anggota Dewan Penguji Lain



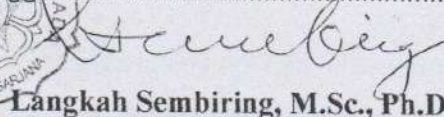
Dr. C.J. Soegihardjo, Apt.

Tesis ini telah diterima sebagai salah satu persyaratan
untuk memperoleh gelar Magister



05 OCT 2006

Tanggal.....


Langkah Sembiring, M.Sc., Ph.D.

Pengelola Program Studi : **Biologi**.....

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit kanker saat ini menjadi penyebab kematian keenam di Indonesia berdasarkan data dari survei kesehatan rumah tangga (SKRT) tahun 2002. Kanker payudara adalah penyakit kanker kedua yang banyak dialami oleh penduduk wanita Indonesia setelah kanker mulut rahim. Setiap tahun terdapat 100 kasus penderita baru per 100.000 penduduk di Indonesia (Anonim, 2003a).

Penyebab kanker sampai saat ini belum diketahui dengan pasti. Dari berbagai penelitian menunjukkan sebagian kanker dipicu oleh gaya hidup yang tidak sehat seperti merokok, kebiasaan makan yang tidak seimbang, minum alkohol, kontak berlebihan dengan sinar matahari serta paparan lingkungan yang tidak sehat (King, 2000). Hal inilah yang menyebabkan para peneliti belum dapat menemukan obat yang dapat menyembuhkan penyakit ini dengan sempurna pada semua stadium.

Pengobatan kanker secara medis yang selama ini dilakukan adalah membuang kanker dengan pembedahan, membunuh sel kanker dengan bahan kimia (kemoterapi) atau merusak sel-sel tersebut dengan radioterapi. Efek samping dan beberapa hambatan serta keterbatasan pada pengobatan secara medis ini menyebabkan orang mulai berpikir pada pengobatan alternatif yang aman, bermanfaat, mudah dalam pelaksanaan, murah, dan didasari penelitian ilmiah yang mendalam (Saputra, 2003).

Paradigma baru dalam pengobatan kanker ini menggunakan ramuan obat bahan alam baik yang bersumber dari tumbuhan, hewan maupun mineral yang digunakan dalam bentuk makanan ataupun obat. Bahan-bahan dari tanaman (*natural product*)

sudah banyak dilaporkan memiliki kemampuan sebagai antikanker. Produk alam ini dipilih karena senyawa-senyawa yang terkandung didalamnya dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai antikanker yang selektif dengan efek samping yang lebih kecil bila dibandingkan dengan obat antikanker sintesis dan harga obat dapat ditekan (Saputra, 2003).

Paradigma baru dalam pengobatan kanker dengan bahan alami ini bertujuan untuk meningkatkan daya tahan tubuh (*immunoterapi*) dan menghambat pembentukan kapiler darah baru (*angiogenesis inhibition*). Terapi menggunakan *angiogenesis inhibitor* adalah suatu pendekatan yang relatif baru untuk terapi tumor/kanker (Saputra, 2003, Kerbel, 2000).

Angiogenesis adalah proses pembentukan pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang sudah ada. Angiogenesis biasanya terjadi selama masa perkembangan embrional dan selama proses fisiologi yang lain seperti penyembuhan luka (Cristofanilli *et al.*, 2002).

Keanekaragaman hayati di Indonesia sangat mendukung untuk pengembangan pemakaian tumbuhan obat untuk kanker, diantaranya adalah tumbuhan benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) yang merupakan salah satu tumbuhan yang hidup sebagai parasit pada pohon teh (*Camellia sinensis* L.). Tumbuhan ini secara empiris digunakan oleh masyarakat sebagai obat antikanker (Anonim, 2003b).

Penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa ekstrak kloroform-metanol benalu teh (*Scurrula atropurpurea* (BL) Danser) diketahui mempunyai aktivitas antitumor (Pasha, 1994). Penelitian lain yang dilakukan oleh Sukardiman, dkk (2002) adalah aktivitas antikanker fraksi n-heksana, etil asetat, n-butanol dari ekstrak

metanol benalu teh (*Scurrula atropurpurea*) dapat menghambat aktivitas enzim DNA topoisomerase. Enzim DNA topoisomerase adalah enzim yang mempunyai fungsi cukup penting dalam proses intraseluler antara lain berperan dalam proses replikasi, transkripsi, rekombinasi DNA, dan proses proliferasi dari sel kanker.

Tumor adalah suatu penyakit yang sel-selnya menunjukkan ciri yang berbeda dengan sel normal. Sel-sel tumor dapat berproliferasi secara tak terkendali. Sel-sel ini akan membelah terus menerus dan akan tumbuh menyusup ke jaringan disekitarnya (invasif) lalu membuat anak sebar (metastasis). Tumor dapat dibedakan menjadi tumor jinak (benigna) dan tumor ganas (maligna). Tumor ganas biasa disebut kanker (Cotran *et al.*, 1994).

Salah satu faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan penyebaran tumor adalah angiogenesis. Angiogenesis adalah pembentukan kapiler darah baru dari pembuluh darah yang telah ada (neovaskularisasi). Angiogenesis pada tumor antara lain dipicu oleh TAF (*Tumour Angiogenesis Factor*) yang disekresi oleh sel tumor. Difusi oksigen dan makanan dari pembuluh darah hanya sampai pada daerah sejauh 1-2 mm dari pembuluh darah, maka pembesaran tumor tergantung kepada bertambahnya jumlah pembuluh darah untuk pasokan darah. Oleh karena peran angiogenesis yang penting pada pertumbuhan dan penyebaran sel tumor ini maka zat (agensia) yang dapat menghambat angiogenesis merupakan hal yang penting bagi pengobatan tumor (Cotran *et al.*, 1994, Kerbel, 2000).

B. Perumusan Masalah

1. Apakah ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) dapat menghambat angiogenesis pada membran korio alantois embrio ayam setelah diimplantasi dengan jaringan tumor payudara tikus (*Ratus norvegicus* L.)?
2. Berapakah dosis efektif ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) dalam menghambat angiogenesis pada membran korio alantois embrio ayam setelah diimplantasi dengan jaringan tumor payudara tikus (*Ratus norvegicus* L.)?
3. Senyawa apa yang terkandung dalam daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) yang diduga berperan menghambat angiogenesis pada membran korio alantois embrio ayam setelah diimplantasi dengan jaringan tumor payudara tikus (*Ratus norvegicus* L.)?

C. Tujuan

1. Untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) terhadap angiogenesis pada membran korio alantois embrio ayam setelah diimplantasi dengan jaringan tumor payudara tikus (*Ratus norvegicus* L.).
2. Untuk mengetahui dosis efektif ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) dalam menghambat angiogenesis pada membran korio alantois embrio ayam setelah diimplantasi dengan jaringan tumor payudara tikus (*Ratus norvegicus* L.).

3. Untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) yang diduga berperan menghambat angiogenesis pada membran korio alantois embrio ayam setelah diimplantasi dengan jaringan tumor payudara tikus (*Ratus norvegicus* L.).

D. Manfaat Penelitian

Dengan mengetahui pengaruh ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) terhadap angiogenesis membran korio alantois embrio ayam setelah implantasi tumor payudara tikus (*Ratus norvegicus* L.) maka diharapkan:

1. Dapat meningkatkan penggunaan dan pengembangan obat tradisional.
2. Dapat memberikan terapi (pengobatan) pada penderita tumor/kanker.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Benalu Teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser)

Tumbuhan benalu teh merupakan tumbuhan terna, bersifat parasit obligat pada pohon teh (*Camellia sinensis* L.). Benalu jenis ini biasanya tumbuh di daerah pengunungan tropis pada perkebunan teh yang tidak produktif lagi. Di Pulau Jawa, jenis-jenis Loranthaceae dikenal ada 38 spesies dan 19 spesies diantaranya dapat hidup pada ketinggian 1300 meter diatas permukaan laut (Sutanti dan Nurtjahjo, 1982; Anonim, 1997).

Tumbuhan benalu teh diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisio : Spermatophyta

Sub divisio : Angiospermae

Kelas : Dicotyledonae

Bangsa : Santales

Suku : Loranthaceae

Marga : *Scurrula*

Jenis : *Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser

(Anonim, 1997)

Nama lain dari benalu teh ini adalah *Loranthus atropurpureus* Blume, sedangkan nama daerah dari benalu teh adalah *kemade*, *kemadean*, *kemladean* (Jawa), *mangadeuh* (Sunda), *Pasilan* (Ind) (Steenis, 1988).

Benalu teh mengandung tanin, flavonoid, dan terpenoid (Pasha, 1994) di samping itu daunnya mengandung alkaloid dan flavonoid (Anonim, 1997). Menurut

Hegnauer (1966), benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) mengandung kuersetin dan melissylalkohol. Manfaat dari benalu teh ini antara lain sebagai obat antiradang, hipertensi, sakit kuning, dan obat kanker (Anonim, 1997, Anonim 2003b)

B. Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair yang diperoleh dengan mengekstraksi kandungan senyawa simplisia nabati atau simplisia hewani dengan menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Anonim, 1995).

Penyarian (ekstraksi) merupakan peristiwa perpindahan masa zat aktif yang semula berada didalam sel ditarik oleh cairan penyari sehingga zat aktif larut dalam cairan penyari. Pada umumnya penyarian akan bertambah baik apabila permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan penyari semakin luas (Anonim, 1986).

Metode ekstraksi yang digunakan ditentukan oleh wujud dan kandungan zat dari bahan yang akan disari (Harborne, 1996). Cara ekstraksi dapat dibedakan menjadi cara dingin (maserasi dan perkolasi) dan cara panas (refluks, soxkletasi, digesti, infus, dan dekok).

Maserasi adalah cara ekstraksi yang paling sederhana dan mudah dilakukan. Bahan simplisia yang dihaluskan sesuai syarat Farmakope Indonesia (umumnya terpotong-potong atau berupa serbuk kasar) disatukan dengan bahan pengekstraksi. Cairan pelarut yang digunakan dalam pembuatan ekstrak adalah pelarut yang baik (optimal) untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif dengan

demikian senyawa tersebut dapat dipisahkan dari bahan dan dari senyawa kandungan lainnya sehingga ekstrak hanya mengandung sebagian besar senyawa kandungan yang diinginkan. Dalam hal ekstrak total, maka cairan pelarut yang dipilih harus dapat melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung, selain itu harus memenuhi beberapa kriteria antara lain selektivitas, ekonomis, mudah dalam pengerjaan, ramah lingkungan dan tidak mempengaruhi zat yang berkhasiat serta aman. Selanjutnya rendaman tersebut disimpan terlindung dari cahaya langsung (untuk mencegah reaksi yang dikatalis cahaya atau perubahan warna) dan dikocok kembali. Lama waktu maserasi berbeda-beda tergantung pada sifat atau ciri campuran senyawa (Anonim, 1986; Anonim, 2000).

C. Tumor

1. Sifat dan klasifikasi tumor

Secara harfiah neoplasia berarti pertumbuhan baru dan disebut neoplasma. Neoplasma adalah massa jaringan yang abnormal, tumbuh berlebihan, tidak terkoordinasi seperti sel normal dan tumbuh terus meski rangsangan yang menimbulkan/memulainya telah hilang. Sel neoplasma bersifat otonom, parasitik dan bersaing dengan sel normal untuk kebutuhan metabolismenya (Cotran *et al.*, 1994, King, 2000).

Siklus sel normal melewati 4 tahap, yaitu: G₁, S, G₂, dan M. Pada tahap G₁ terdapat subtahap yang disebut tahap G₀ yaitu suatu tahap pada saat sel tidak mengalami pembelahan. Jika tidak ada perintah untuk membelah maka sel akan tetap

pada keadaan G_0 . Perbedaan sel tumor dengan sel normal adalah tidak adanya tahap G_0 , sehingga sel-selnya akan terus membelah (Albert *et al.*, 2002)

Istilah tumor mula-mula digunakan untuk pembengkakan akibat peradangan. Kini istilah tumor berarti neoplasma yang menurut sifat biologiknya dibedakan atas tumor jinak (benigna) dan tumor ganas (maligna). Tumor ganas biasa disebut kanker. (Cotran *et al.*, 1994)

Semua tumor baik benigna maupun maligna terdiri dari 2 komponen dasar, yaitu:

- a. Parenkim, yaitu sel neoplasma yang proliferasif, yang menunjukkan sifat pertumbuhan.
- b. Stroma, yaitu pendukung parenkim tumor, terdiri dari jaringan ikat dan pembuluh darah (Cotran *et al.*, 1994)

Tumor jinak tumbuhnya lambat, tidak tumbuh infiltratif, tidak merusak jaringan sekitarnya dan tidak menimbulkan anak sebar pada tempat yang jauh. Tumor jinak masih dibatasi oleh jaringan ikat yang disebut simpai (kapsul), yang memisahkan jaringan tumor dengan jaringan disekitarnya (batasnya tegas). Tumor ini akan tumbuh dan menekan secara perlahan. Hal inilah yang menyebabkan dapat dilakukan eksisi (pembedahan) untuk mengambil jaringan tumor tersebut. Tidak semua tumor jinak berkapsul misalnya hemangioma. (Cotran, *et al.*, 1994)

Tumor ganas (kanker) umumnya tumbuh cepat (progresif), infiltratif, dan merusak jaringan disekitarnya. Batas antara tumor dan jaringan disekitarnya tidak tegas. Kebanyakan tumor ganas invasif dan mampu menembus dinding dan alat tubuh berlumen seperti usus, dinding kapiler darah, dan limfe. Tumor ganas dapat

dibedakan menjadi sarkoma dan karsinoma. Sarkoma bersifat mesenkhimal misalnya fibrosarkoma, limfosarkoma, osteosarkoma. Karsinoma bersifat epitelial, contohnya kanker payudara, lambung, uterus, dan kulit (Cotran, *et al.*, 1994, King, 2000).

Perbedaan-perbedaan di atas dapat disimpulkan pada tabel di bawah ini.

Tabel II.1. Perbandingan tumor jinak (benigna) dan ganas (maligna)

Ciri	Jinak (benigna)	Ganas (maligna)
Batas	Tajam	Tidak tajam, tidak teratur
Kapsul	Ada	Jarang
Cara pertumbuhan	Ekspansif	Infiltratif
Kecepatan pertumbuhan	Rendah	Tinggi
Kemampuan menyebar	Tidak ada	Tinggi
Diferensiasi	Tinggi	Sedang sampai buruk
Aktivitas mitotik	Sedikit	Tinggi

(King, 2000)

Invasi dan metastasis hanya terjadi pada tumor ganas (kanker). Sel-sel tumor ini dapat terlepas dari tumor primer (tumor induk) kemudian memasuki pembuluh darah atau pembuluh limfatik dan menghasilkan pertumbuhan sekunder di tempat yang baru (metastasis). Semua kanker menimbulkan metastasis, kecuali glioma (tumor ganas sel glia) dan karsinoma sel basal pada kulit, keduanya sangat invasif tetapi jarang bermetastasis (Cotran *et al.*, 1994).

Dengan kemampuan metastasis ini, sel kanker dapat hidup dan berproliferasi di tempat lain. Berbeda dengan sel normal, sel kanker dapat menghindari dari program kematian sel (apoptosis). Kemampuannya untuk menyebar ke tempat lain dan kemampuan untuk menghindari dari apoptosis menyebabkan sel kanker dapat bertahan hidup dan melanjutkan pertumbuhan di tempat yang baru. Hal ini ditunjang oleh angiogenesis, pembentukan kapiler darah baru dari pembuluh darah yang telah ada, yang sangat penting untuk pertumbuhan tumor primer dan metastasis.

Angiogenesis ini mensuplai makanan dan oksigen untuk sel tumor, serta memudahkan sel kanker untuk bermetastasis (Albert *et al.*, 2002).

2. Tumor payudara

Tumor payudara muncul sebagai akibat sel-sel abnormal yang terbentuk pada payudara dengan kecepatan membelah yang tidak terkontrol dan tidak beraturan. Sel-sel tumor akan tumbuh pesat sekali sehingga payudara penderitanya akan membesar tidak seperti biasanya (Anonim, 2004).

Kelenjar mammae (payudara) merupakan bagian dari sistem reproduksi pada wanita. Fungsi utama payudara adalah memproduksi dan mensekresi air susu. Payudara merupakan kelenjar yang terdiri atas parenkim, jaringan ikat, dan jaringan lemak. Pada bagian tengah payudara terdapat puting (papila mamaria) yang merupakan tonjolan berpigmen yang dikelilingi oleh areola (Underwood, 2000).

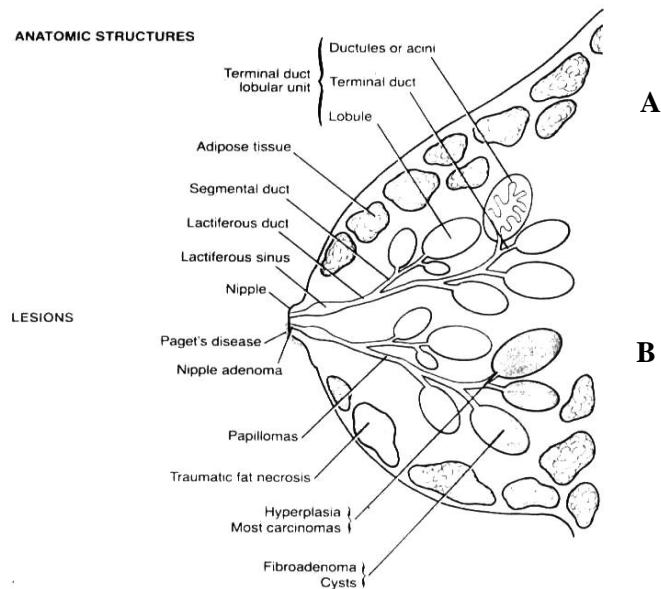
Kelenjar membentuk 15-25 lobuli yang tersusun radier disekitar puting dan dipisahkan oleh jaringan lemak yang bervariasi jumlahnya. Tiap lobulus terdiri atas sejumlah *acini* yang berada dalam jaringan ikat longgar dan berhubungan dengan duktus *intralobularis*. Tiap *acinus* tersusun atas 2 tipe sel, yaitu epitel dan mioepitel (Underwood, 2000).

Duktus *intralobularis* berhubungan dengan duktus *ekstralobularis* yang akan bermuara pada duktus *laktiferus* dan *sinus laktiferus*. Duktus dilapisi oleh sel epitel yang dikelilingi oleh sel mioepitel. Stroma duktus lebih padat dibandingkan dengan stroma lobulusnya (Underwood, 2000).

Tumor payudara dapat bersifat jinak (benigna) dan ganas (maligna). Jenis tumor jinak pada payudara merupakan kombinasi antara unsur jaringan ikat dan epitel. Tumor payudara jinak adalah fibroadenoma, papiloma duktus, adenoma dan tumor jaringan ikat. Fibroadenoma adalah tumor yang paling sering dijumpai, yang berasal dari lobulus mamma, dari unsur stroma jaringan ikat longgar dan kelenjar. Papiloma duktus adalah tumor di dalam duktus besar yang berasal dari epitel duktus. Adenoma merupakan tumor yang tersusun atas struktur tubulus yang seragam dengan jaringan ikat sedikit. Tumor jaringan ikat berasal dari jaringan otot polos yang terdapat dalam mammae (Underwood, 2000).

Tumor payudara maligna (karsinoma) dapat dibedakan menjadi karsinoma non-invasif yaitu sel ganas dalam duktus atau *acinus* lobulus tetapi sel tumor tidak menembus membran basalis. Selain itu juga dijumpai bentuk karsinoma invasif yaitu sel tumor yang mampu menembus membran basalis sekeliling struktur mammae dan menyebar ke jaringan disekitarnya (Underwood, 2000).

Pemicu tumor/kanker payudara belum diketahui dengan pasti, tetapi ada beberapa faktor yang membuat seorang wanita mempunyai resiko terkena penyakit ini antara lain mendapat haid pertama kali pada usia yang sangat muda, terlambat mengalami menopause, kegemukan, tidak pernah melahirkan anak, mendapat terapi hormon, pernah mendapat radiasi pada daerah payudara (Anonim, 2004).



Gambar II.1. Struktur kelenjar mammae

A. Normal

B. Lesi

(Cotran, *et al.*, 1994)

Pengobatan tumor/kanker payudara dapat dilakukan dengan :

- a. pembedahan (pengambilan jaringan tumor),
- b. terapi radiasi, untuk pengobatan tambahan setelah pembedahan,
- c. terapi hormon dan
- d. kemoterapi, untuk pengobatan tambahan setelah pembedahan

(Holland and Frei, 1982).

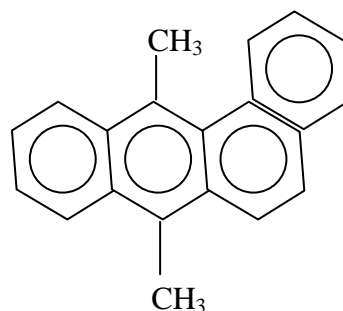
D. Karsinogenesis

Sejumlah agensia yang menyebabkan kerusakan genetik dan menginduksi terjadinya transformasi sel menjadi neoplasma disebut karsinogen. Karsinogen dapat berupa bahan kimia, virus dan radiasi (King, 2000)

Salah satu senyawa karsinogen adalah golongan Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH). PAH merupakan kontaminan lingkungan yang tersebar luas di udara, tanah dan makanan. PAH terbentuk dari asap kendaraan bermotor, asap rokok, pembakaran sampah, proses industri, jelaga, ter, dan batubara. Terdapat bermacam-macam PAH dan banyak yang ditemukan bersifat karsinogen pada manusia. Salah satu golongan PAH adalah DMBA (7,12 Dimetilbenz[a]antrasen). DMBA termasuk dalam golongan senyawa karsinogen sekunder yaitu senyawa karsinogen yang memerlukan metabolisme aktivasi sehingga senyawa ini diubah menjadi bentuk aktif yang dapat berinteraksi dengan DNA sehingga terjadi perubahan yang selanjutnya dimulailah pembentukan tumor (King, 2000).

Karsinogenesis kimia merupakan suatu proses bertahap. Zat karsinogen bekerja memicu perubahan genetik tertentu dalam suatu sel sehingga menyebabkan pembentukan neoplasma atau mengubah neoplasma menjadi kanker (Hodgson and Levi, 2000).

Sel tumor yang mengalami inisiasi dengan fenotipe dan genotipe yang telah berubah mungkin dapat tetap tenang dalam waktu yang lama sebelum berubah menjadi tumor akibat proliferasi sel oleh adanya zat-zat *promotor* (Hodgson and Levi, 2000).



Gambar II.2. Bangun kimia DMBA (7,12-Dimetilbenz[a]antrasen)

DMBA adalah senyawa hidrokarbon aromatik yang dapat menyebabkan tumor payudara pada tikus betina dengan pemberian oral ataupun injeks dan dapat menyebabkan kanker kulit pada mencit (Woo, *et al.*, 1985, Hodgson and Levi, 2000).

E. Uji Toksisitas

Toksisitas merupakan sifat relatif yang digunakan dalam membandingkan suatu senyawa dengan senyawa lain dengan menunjuk ke suatu efek berbahaya atas jaringan biologi tertentu (Donatus, 2005).

Uji toksisitas akut merupakan uji toksisitas dengan memberikan suatu senyawa pada hewan uji pada suatu saat. Maksud uji tersebut adalah untuk menentukan gejala sebagai akibat pemberian suatu senyawa dan untuk menentukan tingkat letalitasnya. Uji ini dirancang untuk menentukan efek toksik suatu senyawa yang akan terjadi dalam masa yang singkat setelah pemejanaan dengan dosis tertentu. Untuk senyawa baru kriteria awal yang biasa digunakan adalah mempergunakan kematian sebagai indeks untuk memperkirakan dosis letal yang mungkin terjadi pada manusia. Respon apapun yang dipilih sebagai ukuran hubungan antara respon atas sistem biologi dan jumlah zat toksik yang diberikan ditunjukkan sebagai hubungan dosis-respon. Bila responnya adalah kematian maka dosis yang menimbulkan kematian pada 50% populasi spesies yang sama dalam waktu yang spesifik dan kondisi yang sama diistilahkan dengan *Median Lethal Dose* atau LD₅₀. Bila pemberian obat dinyatakan dengan konsentrasi maka disebut *Median Lethal Concentration* atau LC₅₀ (Donatus, 2005, Klaassen and Eaton, 1991).

Salah satu metoda uji toksisitas akut adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BST). BST yaitu salah satu metoda dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach untuk menguji bahan-bahan yang bersifat sitotoksik. Uji toksisitas akut dengan metode BST ini ada kaitannya dengan uji sitotoksik jika harga LC_{50} dari uji toksisitas akut $<1000 \mu\text{g/ml}$. Metoda ini sering digunakan untuk skrining awal terhadap senyawa aktif yang terkandung di dalam ekstrak tanaman karena murah, cepat, mudah (tidak memerlukan kondisi aseptis), dan hasilnya dapat dipercaya (Meyer *et al.*, 1982). Lebih dari itu metoda ini dapat digunakan untuk skrining awal terhadap senyawa-senyawa yang diduga berkhasiat sebagai antitumor, sehingga dapat dikatakan uji ini seringkali mempunyai korelasi yang positif dengan potensinya sebagai antikanker (McLaughlin *et al.*, 1998).

F. Angiogenesis

Angiogenesis adalah pembentukan kapiler baru dari pembuluh darah yang telah ada (neovaskularisasi). Angiogenesis adalah suatu proses alami yang biasanya terjadi selama masa perkembangan, yaitu pada perkembangan embrio, pada siklus reproduksi wanita, dan regenerasi jaringan (pada proses penyembuhan luka) juga pada saat terjadi inflamasi kronik. Tetapi angiogenesis dapat juga terjadi pada proses yang tidak normal yaitu pada pertumbuhan tumor (Ferrara and Alitalo, 1999, Folkman, 1996).

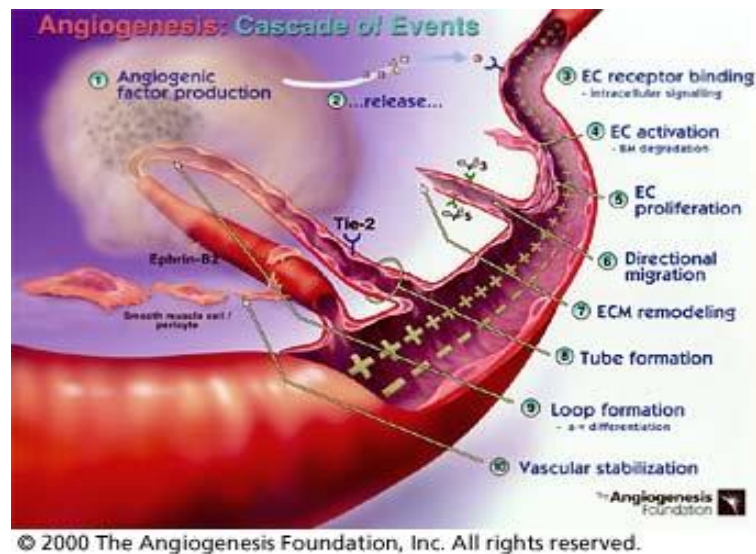
Sel yang mengalami transformasi akan membentuk massa tumor. Pembentukan massa tumor merupakan proses yang kompleks dan dipengaruhi oleh

berbagai faktor. Salah satu faktor yang mempengaruhi pertumbuhan tumor adalah angiogenesis (Cotran *et al.*, 1994).

Angiogenesis tidak hanya penting untuk pertumbuhan tumor primer tetapi juga untuk berlangsungnya metastasis karena vaskularisasi tumor yang meningkat akan meningkatkan kemungkinan sel tumor masuk ke pembuluh darah (Cotran *et al.*, 1994).

Pada saat tumor berukuran $\pm 2 \text{ mm}^3$, terjadi pertumbuhan pembuluh darah untuk mensuplai makanan dan oksigen ke sel-sel tumor serta mengeluarkan produk buangan. Angiogenesis melibatkan proses fisiologi dan patofisiologi kompleks yang diregulasi oleh beberapa faktor pro-angiogenik dan anti-angiogenik (Cristofanilli *et al.*, 2002). Pada pertumbuhan tumor, angiogenesis dipengaruhi oleh faktor-faktor yang dihasilkan oleh sel tumor yang disebut TAF (*Tumour Angiogenesis Factor*). (Kerbel, 2000).

Inisiasi dari angiogenik distimulasi dari sekresi *mitogenic growth factor* (faktor pertumbuhan mitogenik) seperti *Platelet-derived growth factor*, FGF (*Fibroblast Growth Factor*) dan VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Produksi *mitogenic growth factor* ini sangat rendah pada sel normal akan tetapi akan meningkat pada sel tumor (King, 2000).



Gambar II.3. Skema proses angiogenesis
(Anonim, 2000)

Tahap-tahap proses angiogenesis dapat dijelaskan seperti di bawah ini:

1. Jaringan yang sakit atau luka akan memproduksi dan melepas faktor pertumbuhan angiogenik (protein) yang terdifusi ke dalam jaringan didekatnya.
2. Faktor pertumbuhan angiogenik berikatan secara spesifik dengan reseptor pada sel endotelial pembuluh darah yang dekat dengan jaringan luka.
3. Faktor pertumbuhan yang berikatan dengan reseptor akan mengaktifkan sel endotelial. Signal tersebut kemudian dikirim dari permukaan sel ke nukleus. Selanjutnya, sel-sel endotelial mulai memproduksi molekul-molekul baru termasuk enzim. Enzim tersebut akan masuk melalui rongga tipis di sekeliling membran basal.
4. Sel endotelial kemudian mulai berproliferasi dan bermigrasi ke luar melalui membran.

5. Molekul khusus yang disebut molekul adhesi atau integrin ($\alpha_v \beta_3$, $\alpha_v \beta_5$) bertindak sebagai tempat pegangan/kaitan untuk membantu penyebaran pembuluh darah baru.
6. Enzim tambahan (*matrix metalloproteinase*/MMP) diproduksi agar pembuluh darah baru bisa masuk ke jaringan di pembuluh yang menyebar. Ketika pembuluh tersebut mulai meluas, jaringan dibentuk kembali di sekitar pembuluh.
7. Sel endotelial yang menyebar kemudian akan menggulung membentuk pipa pembuluh darah dimana pipa-pipa tersebut akan berhubungan satu sama lain membentuk loop yang bisa bersikulasi ke darah.
8. Akhirnya pipa-pipa pembuluh darah baru yang terbentuk tersebut distabilkan oleh sel-sel otot khusus (sel otot halus, *pericyt*) yang akan memberi dukungan struktural.

G. Penghambatan Angiogenesis

Penghambatan angiogenesis dibagi menjadi dua kelas, yaitu penghambatan secara langsung dan tidak langsung. Penghambat angiogenesis secara langsung seperti vitaxin, angiostatin dapat mencegah sel-sel endotelial pembuluh darah berproliferasi dan bermigrasi atau menghindar dari kematian sel pada respon spektrum dari protein proangiogenik. Contoh protein proangiogenik, yaitu VEGF, bFGF, IL-8, *Platelet Derivat Growth Factor* (PDGF), dan PD-EGF. Penghambat angiogenik secara tidak langsung umumnya mencegah ekspresi atau menghambat aktivitas protein tumor yang mengaktifkan angiogenesis atau juga menghambat

ekspresi reseptor protein tumor pada sel endotelial seperti bFGF, VEGF dan TGF (Kerbel and Folkman, 2002).

Pendekatan terapeutik untuk pengobatan tumor dapat dijelaskan melalui dua mekanisme antiangiogenik yang berbeda, yaitu

- (1). agen vaskulostatik: agen yang mengganggu proses pembentukan pembuluh darah baru, dan
- (2). agen vaskulotoksik: merupakan agen yang menggunakan elemen pembuluh darah untuk mencapai toksisitas tertentu sehingga menghasilkan efek antitumor (Matter, 2001).

Penghambatan angiogenesis merupakan terapi terbaru dalam pengobatan tumor. Penghambatan angiogenesis ini bertujuan untuk mengurangi pasokan darah dan nutrisi ke tumor. Pembuluh darah tersebut merupakan penyokong bagi massa tumor. Usaha ini diharapkan akan mengurangi dan mencegah pertumbuhan tumor karena obat-obat antiangiogenesis tersebut akan menghentikan pembuluh darah baru di sekitar tumor dan memutus jaringan kapiler yang abnormal tetapi tidak mempengaruhi pembuluh darah yang normal (Folkman, 1996).

Agensia dari alam yang diketahui mampu menghambat angiogenesis antara lain vinblastin, yaitu suatu metabolit sekunder yang diisolasi dari tanaman *Catharanthus rosea* (Vacca, *et al.*, 1999). Melalui beberapa penelitian, flavonoid yang banyak dijumpai pada tanaman juga mempunyai aktivitas sebagai penghambat proliferasi sel dan angiogenesis. Flavonoid tersebut antara lain adalah kuersetin (Tan, *et al.*, 2003) dan genistein (derivat isoflavonoid) (Fotsis, *et al.*, 1997). Bahan-bahan

sintetik yang diketahui dapat menghambat angiogenesis adalah cyclosporin (Iurlaro, *et al.*, 1998) dan obat nonsteroidal anti-inflamasi (Jones, *et al.*, 1999).

H. Membran Korio Alantois (MKA)

Embrio pada golongan burung mempunyai beberapa lapis membran embrionik. Secara umum membran tersebut berfungsi untuk melindungi embrio dari tekanan dan sebagai tempat respirasi, ekskresi, dan fungsi-fungsi lain selama perkembangan embrio. Membran-membran tersebut adalah amnion, chorion, *yolk sac* dan alantois (Storer and Usinger, 1957).

Salah satu membran ekstra embrionik pada embrio ayam adalah alantois. Alantois terbentuk dari lapisan endoderma dan mesoderma splanchnis ekstraembrional yang dalam perkembangannya akan bergabung dengan korion membentuk membran korio alantois (Patten, 1929).

Membran korio alantois akan muncul pada hari ke 4 atau ke 5 dan diikuti dengan pertumbuhan pembuluh darah yang meluas diatas permukaan kuning telur dan segera menutup seluruh daerah tersebut. Membran ini berfungsi sebagai tempat sirkulasi, tempat pernafasan, bertanggungjawab terhadap perkembangan embrio, dan sebagai tempat pembuangan (Knighton, *et. al.*, 1977).

Membran korio alantois embrio ayam dapat dipergunakan untuk mempelajari respon angiogenesis akibat implantasi jaringan tumor. Membran korio alantois embrio ayam secara anatomis sangat sesuai sebagai media dalam uji angiogenesis karena sangat kaya akan pembuluh darah. Beberapa metode lain untuk uji angiogenesis secara *in vivo* antara lain dengan menggunakan the *rabbit ear chamber*,

the rat air pouch, the hamster cheek pouch, the chick yolk sac and the rabbit or rat cornea (Knighton, *et. al.*, 1977. Ribatti, *et. al.*, 1997).

I. Landasan Teori

Tumor (neoplasma) adalah massa jaringan yang abnormal, tumbuh berlebihan, tidak terkoordinasi seperti sel normal dan tumbuh terus meski rangsangan yang menimbulkan/memulainya telah hilang. Tumor bersifat otonom, parasitik dan bersaing dengan sel normal untuk kebutuhan metabolismenya. Menurut sifat biologiknya tumor dibedakan atas tumor jinak (benigna) dan tumor ganas (maligna). Tumor ganas biasa disebut dengan kanker. (Cotran *et al.*, 1994, King, 2000).

Tumor jinak tumbuhnya lambat, tidak tumbuh infiltratif, tidak merusak jaringan sekitarnya, dan dibatasi oleh kapsul sehingga tidak menimbulkan anak sebar pada tempat yang jauh. Tumor ganas (kanker) umumnya tumbuh cepat (progresif), infiltratif dan merusak jaringan disekitarnya. Batas antara tumor dan jaringan disekitarnya tidak tegas. Kebanyakan tumor ganas bersifat invasif dan mampu bermestasis (Cotran, *et al.*, 1994, King, 2000).

Dengan kemampuan metastasis ini, sel kanker dapat hidup dan berproliferasi di tempat lain. Kemampuannya untuk menyebar ke tempat lain dan kemampuan untuk menghindari dari apoptosis menyebabkan sel-sel ini dapat bertahan hidup dan melanjutkan pertumbuhan di tempat yang baru. Hal ini ditunjang oleh angiogenesis (Albert *et al.*, 2002).

Angiogenesis (neovaskularisasi) adalah pembentukan kapiler darah baru dari pembuluh darah yang telah ada. Angiogenesis antara lain dipicu oleh TAF (*Tumour*

Angiogenesis Factor) yang disekresi oleh sel tumor. Angiogenesis sangat penting untuk pertumbuhan tumor primer dan metastasis karena angiogenesis mensuplai makanan dan oksigen untuk sel tumor, serta memudahkan sel kanker untuk bermetastasis (Albert *et al.*, 2002, Kerbel, 2000).

Penghambatan angiogenesis merupakan strategi yang tepat dalam pengobatan kanker karena angiogenesis mempunyai arti penting bagi pertumbuhan dan penyebaran sel tumor (Cotran *et al.*, 1994, Kerbel, 2000). Diduga apabila ada agen/zat kimia yang mampu menghambat angiogenesis maka berpotensi sebagai obat antikanker.

Benalu teh (*Scurrula artropurpurea* [Blume] Danser) merupakan salah satu tanaman yang hidup sebagai parasit pada pohon teh (*Camellia sinensis* L.) yang diketahui secara empiris sebagai obat kanker (Anonim, 2003b). Kandungan senyawa-senyawa yang terdapat didalam tumbuhan benalu teh inilah yang berpotensi sebagai antikanker. Metabolit sekunder yang terdapat dalam daun benalu teh adalah tanin, flavonoid dan terpenoid (Pasha, 1994). Menurut Hegnauer (1966) benalu teh mengandung kuersetin dan melissylalkohol. Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa flavonoid mempunyai beberapa aktivitas biologis antara lain sebagai antiinflamasi, antioksidan, antialergi, hepatoprotektif, antitrombotik, antiviral, dan antikarsinogenik (Ebadi, 2002). Kuersetin, salah satu derivat dari flavonoid diketahui berpotensi dalam menghambat proliferasi sel dan angiogenesis pada kanker (Tan, *et al.*, 2003 dan Fotsis, *et al.*, 1993).

Pengamatan respon angiogenesis dapat dilakukan pada membran korio alantois embrio ayam yang kaya akan pembuluh darah akibat induksi jaringan tumor. Respon

angiogenesis pada membran korio alantois akibat implantasi jaringan tumor ini dapat diamati berupa pertumbuhan pembuluh darah baru dari pembuluh darah hospes yang memanjang dan mengumpul ke arah implan.

Pemberian perlakuan ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) pada membran korio alantois embrio ayam yang telah diimplantasi jaringan tumor payudara diharapkan mampu menghambat proses angiogenesis yang diinduksi oleh implan jaringan tumor tersebut.

J. Hipotesis

Daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) mampu menghambat pertumbuhan angiogenesis pada membran korio alantois embrio ayam setelah diimplantasi tumor payudara tikus (*Ratus norvegicus* L.).

III. METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat untuk ekstraksi dan skrining fitokimia: seperangkat alat untuk maserasi, *rotary evaporator* (Buchi®), neraca analitik, cawan porselin, oven, bejana pengembang, lampu ultraviolet.

Alat untuk uji toksisitas: vial (flakon), mikropipet, *vortex*, aerator, bejana penetasan.

Alat untuk induksi karsinogenesis: jarum kanul, timbangan, *vortex*, tabung reaksi.

Alat untuk uji antiangiogenesis: seperangkat alat pembedahan, inkubator, alat *candling*, *laminar air flowhood*, *mini drill*, karet hisap, mikropipet, *micropore filter* 0.22 μm (Millex®GS, *sprit* 5 ml steril (Terumo®), cawan petri, pinset dan vial (flakon), kamera FUJICA® ST801 *Extension tube* FORMACRO.

Alat untuk pembuatan preparat histopatologis: oven, mikrotom, *hot plate*, *holder*, skapel, gunting, pinset, *staining dish*, kamera OLYMPUS® BHB PM10A.

2. Bahan

Bahan ekstraksi dan skrining fitokimia: daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) yang diperoleh dari daerah Cisarua, Puncak, Jawa Barat pada bulan Februari 2005 (musim penghujan) dan telah diidentifikasi di Herbarium Bogoriensis, Bogor, etanol 80 %, lempeng silica gel (GF₂₅₄), lempeng

selulosa, etil asetat, asam format, asam asetat glasial, metanol, aquades, penyemprot sitroborat, Liebermann Burchard (LB) dan vanilin asam sulfat (VAS).

Bahan uji toksisitas: ekstrak dari daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser), anak udang *Artemia salina* Leach umur 48 jam merk Golden West, ALB (air laut buatan) berkadar garam 5 permil, DMSO (dimetilsulfoksida) merk E. Merck, suspensi ragi (Fermipan ®).

Bahan induksi karsinogenesis: Tikus betina (*Ratus norvegicus* L) galur Sprague Dawley umur 5 minggu yang diperoleh dari UPHP (Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan), DMBA (7,12-dimethyl-1,2-Benzanthracene) merk Sigma, minyak jagung, pakan tikus AD 2 yang diproduksi oleh COMFEED Surabaya.

Bahan uji antiangiogenesis: telur ayam SPF (*Specific Pathogen Free*) berembrio umur 9 hari yang diperoleh dari PT BIOFARMA Bandung, ekstrak etanol daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser), DMSO (dimetilsulfoksida) merk E. Merck, alkohol, Betadine®, bufer antibiotika, parafin solidum.

Bahan pembuatan preparat histopatologis: formalin 10%, alkohol, paraplas, albumin Mayer, xylol, toluol, ehrlich hematoxylin dan eosin.

B. Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Bahan yang digunakan adalah telur ayam SPF (*Specific Pathogen Free*) berembrio umur 9 hari yang dibagi menjadi 8 kelompok yaitu 4 kelompok

kontrol dan 4 kelompok perlakuan, dengan pembagian seperti tampak pada tabel III.1.

Bahan antiangiogenesis yang digunakan adalah ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser). Variasi dosis bahan uji didasarkan pada hasil uji toksisitas dengan metode BST (*Brine Shrimp Lethality Test*) yaitu 40 µg/ml, 80 µg/ml, 120 µg/ml dan 160 µg/ml. Untuk jumlah sampel yang digunakan, berdasarkan rumus Freederer $(t-1)(n-1) > 15$, t adalah jumlah perlakuan dan n adalah jumlah pengulangan dari tiap kelompok (Sastrosupadi, 1997).

Tabel III.1. Pengelompokan telur pada uji angiogenesis dengan metoda MKA

Kelompok	Perlakuan	Jumlah Telur
I	Implantasi jaringan payudara normal (kontrol negatif)	5
II	Implantasi jaringan payudara normal + pelarut DMSO 100 µl	5
III	Implantasi jaringan tumor payudara (kontrol positif)	5
IV	Implantasi jaringan tumor payudara + pelarut DMSO 100 µl	5
V	Implantasi jaringan tumor payudara + ekstrak daun benalu teh dosis 40 µg/ml	5
VI	Implantasi jaringan tumor payudara + ekstrak daun benalu teh dosis 80 µg/ml	5
VII	Implantasi jaringan tumor payudara + ekstrak daun benalu teh dosis 120 µg/ml	5
VIII	Implantasi jaringan tumor payudara + ekstrak daun benalu teh dosis 160 µg/ml	5

C. Cara Kerja

1. Pembuatan serbuk

Sebanyak 5 kilogram daun segar benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) dibersihkan dari kotoran dengan cara mencuci di air mengalir dan dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 50° C selama 24 jam. Bahan yang

sudah kering digiling dengan mesin penggiling dan diayak sehingga didapatkan serbuk. Serbuk yang didapatkan sebanyak 1,5 kg.

2. Ekstraksi bahan

Bahan yang digunakan adalah daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser). Serbuk daun benalu teh disari dengan cara maserasi, 100 gram serbuk daun benalu teh direndam dengan 450 ml etanol 80% selama 3x24 jam kemudian disaring dengan kertas saring sehingga diperoleh filtrat (sari etanol) I dan ampas direndam kembali dengan etanol 80 % 450 ml selama 3x24 jam. Hal yang sama dilakukan untuk memperoleh filtrat II dan III. Setelah diperoleh filtrat I, II dan III, ketiga filtrat tersebut dicampur dan diuapkan dengan *rotary evaporator* dan dipekatkan dengan penangas air sampai didapatkan sari kental. Hasil yang diperoleh ditimbang dan diperoleh hasil 9,5 g. Sari yang diperoleh (ekstrak kental) diuji daya toksisitasnya terhadap larva *A. salina* untuk mendapatkan nilai LC₅₀.

3. Pemeriksaan kandungan kimia ekstrak

Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendamennya, sehingga dapat diketahui nilai kesetaraan dari ekstrak etanol tersebut. Rumus penghitungan rendamen adalah

$$\% \text{ rendamen} = \frac{\text{Berat hasil ekstraksi}}{\text{Berat awal simplisia}} \times 100\%$$

(Markham, 1982)

Kandungan senyawa kimia ekstrak kental dianalisis berdasarkan golongannya. Pereaksi yang digunakan adalah pereaksi warna khas untuk setiap golongan.

a. Identifikasi alkaloid

Ekstrak etanol diuapkan sampai kering kemudian ditambahkan 20 ml CHCl_3 dipanaskan dipenangas air dan disaring. Kemudian ditambahkan asam klorida 2N lalu dimasukkan dalam tabung reaksi masing-masing 5 ml, ditambahkan beberapa tetes pereaksi Dragendorff dan pereaksi Meyer. Terbentuknya endapan merah bata dengan pereaksi Dragendorff dan endapan putih dengan pereaksi Meyer menunjukkan adanya alkaloid.

b. Identifikasi steroid dan triterpenoid

Ekstrak etanol diuapkan sampai kering, lalu ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat melalui dinding tabung. Jika terbentuk warna merah menunjukkan adanya terpenoid dan jika hijau menunjukkan steroid.

c. Identifikasi aglikon flavon/flavonoid

Ekstrak etanol diuapkan sampai kering, lalu ditambahkan asam klorida pekat dan logam magnesium (shinoda test), jika terbentuk warna merah atau jingga menunjukkan adanya flavonoid.

d. Identifikasi kumarin

Ekstrak etanol yang sudah diencerkan ditambah air panas, kemudian ditambah amonia 10% jika terjadi flouresensi kuning kehijauan atau kebiruan menunjukkan adanya kumarin.

e. Identifikasi saponin

Ekstrak etanol yang sudah diencerkan dikocok vertikal selama 10 detik dan didiamkan selama 10 menit. Bila busa yang dihasilkan stabil menunjukkan adanya saponin.

f. Identifikasi tanin

Ekstrak kental ditambah 3 tetes larutan FeCl_3 lalu diamati perubahan warna menjadi biru kehijauan atau hijau tua maka positif mengandung tanin (Harbone, 1996 ; Anonim 1987).

Dari hasil skrining fitokimia yang positif selanjutnya diuji dengan menggunakan kromatografi lapis tipis.

a. Identifikasi flavonoid

Adanya flavonoid diamati dengan menotolkan ekstrak etanol pada lempeng selulosa dan dikembangkan pada bejana pengembang dengan fase gerak etil asetat:asam format:asam asetat glasial:air (100:11:11:15), v/v. Setelah kering lempeng disemprot dengan sitroborat dan dipanaskan di oven pada suhu 100°C kemudian diamati dibawah lampu ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm dan 365 nm. Sebagai pembanding digunakan rutin yang telah dilarutkan dengan metanol. Jika terdapat flavonoid maka akan nampak flouresensi kuning (Wagner *et al.*, 1984).

b. Identifikasi terpenoid/steroid

Adanya terpenoid diamati dengan menotolkan ekstrak etanol pada lempeng silika gel (GF_{254}) dan dikembangkan pada bejana pengembang dengan fase gerak etil asetat:metanol:air (77:15:8), v/v. Setelah kering lempeng disemprot dengan Liebermann Burchard dan dipanaskan di oven pada suhu 100°C kemudian diamati pada cahaya tampak. Jika terdapat terpenoid maka akan nampak warna coklat tua (Wagner *et al.*, 1984).

c. Identifikasi minyak atsiri

Adanya minyak atsiri dapat diamati dengan menotolkan ekstrak etanol pada lempeng silika gel (GF₂₅₄) dan dikembangkan pada bejana pengembang dengan fase gerak toluena:etil asetat (93:7), v/v. Setelah kering lempeng disemprot dengan vanillin asam sulfat dan dipanaskan di oven pada suhu 100°C kemudian diamati pada cahaya tampak. Jika terdapat minyak atsiri maka akan nampak warna biru (Wagner *et al.*, 1984).

4. Uji toksisitas

a. Pembuatan konsentrasi ekstrak daun benalu teh

Ekstrak kental daun benalu teh (sampel uji) ditimbang sebanyak 500 mg kemudian dilarutkan dalam DMSO sebanyak 2 ml dan ditambahkan ALB (air laut buatan) sampai volume 100 ml sehingga diperoleh konsentrasi sebanyak 5 mg/ml atau 5 µg/µl. Dari larutan stok kemudian dibuat seri konsentrasi sampel uji dengan cara mengambil masing-masing 25 µl, 50 µl, 75 µl 100 µl dan 200 µl dari larutan stok dengan mikropipet untuk mendapatkan konsentrasi akhir 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µl/ml, 100 µg/ml dan 200 µg/ml. Kontrol pelarut dibuat dengan cara yang sama dengan sampel uji tetapi hanya menggunakan pelarut saja yaitu DMSO 100 µl/5ml. Masing-masing konsentrasi tersebut dimasukkan ke dalam 6 flakon untuk replikasi.

b. Penetasan telur *A. salina* [Leach]

Telur *Artemia* yang akan ditetaskan terlebih dahulu direndam dalam aquades selama lebih kurang 1 jam. Telur yang mengapung dibuang dan yang mengendap dimasukkan dalam tempat penetasan yang telah diisi air laut buatan berkadar garam 5 permil. Tempat penetasan ini berupa wadah dengan 2 kompartemen yaitu gelap dan

terang. Telur dimasukkan dalam kompartemen gelap, setelah kurang lebih 24 jam telur akan menetas dan larva akan bergerak menuju kompartemen terang. Tempat penetasan diberi aerasi untuk memenuhi kebutuhan oksigen dan untuk mengaduk telur agar tidak mengendap/menempel pada dinding wadah penetasan. Setelah larva berumur 48 jam baru digunakan untuk uji.

c. Uji toksisitas

Beberapa konsentrasi ekstrak yang telah disiapkan dalam flakon dicampur dengan ALB sebanyak 4 ml dan dibuat homogen dengan alat vortex. Sepuluh ekor larva *Artemia* yang sehat dimasukkan dengan hati-hati dalam masing-masing flakon dengan menggunakan pipet. Setelah larva *A. salina* dimasukkan dalam flakon ditambahkan ke dalamnya 1 tetes suspensi ragi 3mg/5ml sebagai sumber makanan. Selanjutnya ditambahkan ALB sampai volume 5 ml. Setelah itu flakon-flakon ini diletakan dibawah penerangan selama 24 jam dan kemudian dihitung jumlah larva udang yang mati (Meyer *et al*, 1982).

5. Induksi karsinogenesis

Hewan uji yang digunakan adalah tikus betina (*Ratus norvegicus* L) galur Sprague Dawley berumur 5 minggu yang sudah diadaptasikan dalam lingkungan laboratorium selama 1 minggu sebelum perlakuan. Hewan uji diberi pakan dalam bentuk pelet dan minuman air diberikan *ad libitum*. Tikus dipelihara dalam ruangan dengan ventilasi yang cukup, suhu ruangan 28 – 32 °C, kelembaban nisbi 98%, dengan pengaturan gelap terang masing-masing 12 jam.

Hewan uji tersebut diinduksi dengan DMBA (7,12-dimethyl-1,2-Benzanthracene) dengan dosis 20 mg/kg BB 2x seminggu selama 6 minggu secara

oral. DMBA dilarutkan dalam minyak jagung dan divortex hingga jernih. Volume yang diberikan 1 ml per cekok. Volume ini tidak boleh melebihi volume maksimum yang diperbolehkan diberikan secara per-oral (antara 0,5-1 ml per cekok).

Perkembangan nodul yang terbentuk pada hewan uji dilihat setiap minggu. Setelah terbentuk nodul dengan umur 7 minggu (diameter rata-rata nodul antara 3-4 cm) maka dilakukan pembedahan untuk mengambil jaringan tumor yang akan digunakan untuk uji antiangiogenesis (Singletary, *et al.*, 1998, Susilowati, 2004).

6. Uji antiangiogenesis

a. Pemeraman telur SPF

Telur SPF berumur 0 hari yang diperoleh dari PT BIOFARMA Bandung, sebelum dimasukan di dalam inkubator disemprot dahulu dengan alkohol 70% dan didiamkan dalam suhu ruangan kurang lebih 3 jam, setelah itu dimasukan dalam inkubator dengan suhu 37,5°C. Pada hari ke 5-9 letak telur diputar dengan tujuan pemerataan panas. Pada hari ke-6 telur-telur tersebut *dicandling* untuk melihat perkembangan embrio ditandai dengan terlihatnya pembuluh darah pada kerabang. Pada hari ke 9 telur berembrio ini siap digunakan untuk uji angiogenik (Buddingh, [n.a]).

b. Pembuatan konsentrasi ekstrak daun benalu teh

Variasi konsentrasi dari ekstrak daun benalu teh yang digunakan adalah berdasarkan nilai LC₅₀ dari uji toksisitas dengan metode BST (*Brine Shrimp Lethality Test*) yaitu 40 µg/ml, 80 µg/ml, 120 µg/ml dan 160 µg/ml. Ekstrak kental ditimbang sebanyak 500 mg kemudian dilarutkan dalam DMSO sebanyak 2 ml dan ditambahkan *BufferPhosphat Saline* (BPS) sampai volume 100 ml sehingga

diperoleh konsentrasi sebanyak 5 mg/ml atau 5 µg/µl. Dari larutan stok kemudian dibuat seri konsentrasi sampel uji dengan cara mengambil masing-masing 40 µl, 80 µl, 120 µl dan 160 µl dari larutan stok dengan mikropipet untuk mendapatkan konsentrasi akhir 40 µg/ml, 80 µg/ml, 120 µg/ml dan 160 µg/ml. Kontrol pelarut dibuat dengan cara mengambil DMSO sebanyak 100 µl (volume terbesar) yang dilarutkan dalam 5 ml BPS. Kontrol pelarut dan variasi konsentrasi ekstrak tersebut disterilkan dengan cara disaring dengan millipore dan dimasukkan dalam flakon steril.

c. Persiapan jaringan implan

Tikus betina (*Ratus norvegicus* L.) yang telah mempunyai nodul pada daerah kelenjar mammae dietanasi dengan eter/kloroform untuk dibedah guna mengambil jaringan tumor payudara yang akan diimplantasikan pada membran korio alantois. Jaringan tumor (nodul) tersebut dipotong dengan ukuran 4 x 4 mm (Knighton, *et.al.*, 1977). Potongan jaringan tersebut untuk sementara diletakkan dalam BPS yang telah diberi antibiotika (Ampisilin dan Streptomisin) untuk kemudian digunakan dalam uji antiangiogenik. Pemotongan jaringan tumor dilakukan dalam *laminar air flowhood*. Hal yang sama dilakukan pada tikus normal untuk mendapatkan jaringan payudara normal yang akan diimplantasikan pada kelompok kontrol normal.

d. Uji antiangiogenesis

Telur ayam SPF berembrio umur 9 hari yang sudah dikelompokkan dalam 8 kelompok dan masing-masing kelompok 5 telur, terlebih dahulu disucihamakan dengan betadine atau alkohol. Dengan posisi telur horizontal dan dilakukan diruang gelap, telur diteropong dan pada kerabang telur diberi tanda letak batas ruang udara, lokasi embrio dan daerah yang akan dibuat jendela (lubang). Kerabang telur pada

bagian kutub yang mengandung ruang udara dan kerabang dibagian atas embrio disucihamakan dengan betadine. Kerabang bagian kutub yang sudah diberi tanda dilubangi dengan alat pelubang dan kemudian dilanjutkan dengan bagian kerabang diatas embrio. Udara dari ruang udara (pada kerabang bagian kutub) diaspirasi dengan karet penghisap sampai membran korio alantois yang melekat pada membran telur lepas. Telur tersebut disucihamakan lagi dan dimasukkan dalam *laminar air flowhood* dengan posisi horizontal dengan ruang udara buatan terletak pada bagian atas.

Kerabang telur diatas embrio dipotong dengan gergaji (*mini drill*) hingga membentuk jendela segi empat dengan luas 1 cm². Melalui jendela ini jaringan tumor diimplantasi ke dalam membran korio alantois. Pada kelompok perlakuan ditetaskan bahan uji di sekitar implan sebanyak 50 µl sesuai dosis perlakuan. Lubang ini kemudian ditutup dan diberi parafinum solidum yang sedang mencair agar tutup dapat melekat. Lubang pada kutub telur juga ditetesi dengan parafinum solidum yang sedang mencair (Buddingh, [n.a], Knighton *et al.*, 1976).

Telur-telur tersebut diinkubasi pada suhu 37°C dan kelembaban 60 % selama 72 jam. Setelah inkubasi, kerabang telur dibuka dengan gunting dan membran korio alantois (MKA) dilepas dari kerabang dengan hati-hati dengan bantuan pinset. MKA tersebut direntangkan pada cawan arloji dan ditempelkan pada kertas saring yang telah dilubangi pada bagian tengahnya. Kemudian dilakukan pemotretan untuk kemudian dilakukan pengamatan dengan menghitung pertambahan jumlah pembuluh darah baru yang terbentuk.

7. Pembuatan preparat histologis

MKA yang ditempelkan pada kertas saring direndam dalam larutan formalin 10% selama semalaman. Untuk menghilangkan larutan fiksatif dalam jaringan dilakukan pencucian (*washing*) dengan alkohol 70% hingga bersih.

MKA tadi dipotong segiempat (kurang lebih 1 cm²), sehingga didapatkan potongan segiempat yang terdiri dari MKA dengan jaringan implantasi dibagian tengah. Kemudian dilakukan proses dehidrasi dengan alkohol bertingkat yang bertujuan untuk menarik air yang ada dalam jaringan sehingga dapat diisi dengan paraplas. Pencucian ini dilakukan dalam: alkohol 70 % 1 x @ 30 menit → alkohol 80 % 2 x @ 30 menit → alkohol 90 % 2 x @ 30 menit → alkohol 96 % 1 x @ 30 menit → alkohol absolut 1 x @ 30 menit. Untuk menarik alkohol dalam jaringan dilakukan proses penjernihan (*clearing/dealkoholisasi*) dalam toluol selama semalam.

Selanjutnya dimulai proses infiltrasi paraplas yaitu memasukan jaringan secara berturut-turut dalam toluol-paraplas selama 30 menit, paraplas I selama 45 menit, paraplas II selama 45 menit dan paraplas III selama 45 menit, semua proses ini dilakukan didalam oven.

Setelah infiltrasi paraplas selesai, dilakukan penanaman (*embedding*) yaitu meletakkan jaringan dalam kotak yang sudah terisi paraplas cair. Posisi jaringan diletakkan vertikal (tegak) dan dibiarkan sampai paraplas beku.

Setelah beku, blok paraplas yang berisi jaringan dikeluarkan dari kotaknya dan dibentuk trapezium, kemudian ditempelkan pada holder. Kemudian dilanjutkan dengan proses pengirisan (*section*) dengan alat mikrotom dengan ketebalan 5 µm.

Proses selanjutnya adalah penempelan irisan pada gelas benda (*affeksing*) dengan bantuan albumin Mayer dan aquades. Kemudian gelas benda diletakkan pada *hot plate* sampai irisan merentang bagus dan menempel dengan baik pada gelas benda.

Tahap pewarnaan dimulai dengan menghilangkan paraplas dalam jaringan (deparafinasi) dengan merendam dalam xylol selama 24 jam. Selanjutnya adalah dehidrasi dalam alkohol bertingkat dari alkohol 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, sampai 30%, dan aquades. Kemudian dimasukkan dalam ehrlich hematoxylin selama 7-10 detik, dicuci air mengalir 10 menit dan dicuci aquades. Kemudian berturut-turut dicelupkan kembali pada alkohol 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, dan dimasukkan dalam eosin selama 2 menit, dicelupkan lagi dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, alkohol absolut. Dan dimasukkan dalam xylol minimal 10 menit. Proses dehidrasi dalam alkohol bertingkat dan aquades dilakukan dengan mencelupkan preparat selama 5 detik.

Setelah pewarnaan selesai preparat ditutup dengan gelas penutup (*mounting*) dan pada gelas benda diberi label. Preparat dapat diamati dibawah mikroskop cahaya untuk melihat perubahan-perubahan struktur yang terjadi baik pada pembuluh darah MKA maupun pada implan tumor dan membandingkannya dengan kelompok kontrol (Bancroft and Cook, 1984).

D. Analisis hasil

Uji toksisitas dengan metode BST (*Brine Shrimp Lethality Test*) untuk menentukan nilai LC_{50} . Perhitungan LC_{50} dengan menggunakan analisis probit.

Induksi karsinogenesis pada tikus dilakukan secara deskriptif dengan mengamati perkembangan nodul dan nodul yang digunakan adalah nodul yang telah berumur 7 minggu dengan diameter nodul antara 3 – 4 cm.

Uji antiangiogenik ekstrak daun benalu teh terhadap angiogenesis MKA ayam akibat implantasi tumor payudara dilakukan dengan 2 cara yaitu secara makroskopis dan mikroskopis.

Pengamatan secara makroskopis dilakukan secara visual dengan mengamati hasil pemotretan. Pengamatan difokuskan pada daerah implan dan sekitar implan. Selanjutnya dilakukan penghitungan (skoring) terhadap pembuluh darah baru (angiogenesis) yang terbentuk disekitar daerah implan dengan menggunakan bantuan lup. Setiap pembuluh darah baru diberi nilai 1. Pengamatan terhadap pembuluh darah baru yang terbentuk pada dan di sekitar implan harus dibedakan dengan pembuluh darah utama/asal pada MKA. Pembuluh darah utama/asal mempunyai ukuran yang lebih besar sedangkan pembuluh darah baru merupakan pembuluh darah yang lebih kecil/halus (Ribatti, 1997)

Masing-masing skor kemudian dikonversikan dalam bentuk prosentase. Data yang didapat kemudian dibandingkan dengan rata-rata dari kelompok implan jaringan tumor payudara (kontrol positif) sehingga didapat prosentase (%) pertumbuhan angiogenesis.

$$\% \text{ Pertumbuhan Angiogenesis} = \frac{\text{Jumlah pembuluh darah pada kelompok perlakuan}}{\text{Rata-rata jumlah pembuluh darah kontrol positif}} \times 100\%$$

Setelah diperoleh prosentase pertumbuhan angiogenesis kemudian dilakukan penghitungan nilai prosentase penghambatan angiogenesis dengan persamaan sebagai berikut :

$$\% \text{ Penghambatan Angiogenesis} = 100\% - \% \text{ pertumbuhan angiogenesis}$$

Data yang diperoleh dari hasil penghitungan yang berupa prosentase penghambatan kemudian dianalisis secara statistik Non Parametrik dengan menggunakan metode Kruskal Wallis dan diteruskan dengan Mann Whitney dengan taraf kepercayaan 95% ($p < 0,05$)

Pemeriksaan mikroskopis (preparat histologis) dilakukan dengan mengamati respon angiogenesis yang terjadi pada MKA pada masing-masing kelompok perlakuan. Data mikroskopis ini merupakan data pendukung.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Ekstraksi Daun Benalu Teh

Pada penelitian ini digunakan daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) karena pada uji pendahuluan yaitu membandingkan toksisitas antara ekstrak daun dan batang benalu teh dengan metode BST didapatkan hasil harga LC_{50} daun benalu teh lebih kecil jika dibandingkan dengan batang benalu teh. Hal ini menunjukkan daun benalu teh lebih toksis.

Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dengan pelarut etanol 80%. Pemilihan cara ekstraksi dengan maserasi karena senyawa-senyawa yang diduga merupakan komponen aktif dari tanaman belum diketahui secara pasti sehingga diharapkan tidak ada zat aktif yang rusak oleh pemanasan karena metode maserasi tidak menggunakan pemanasan. Selain itu maserasi merupakan metode ekstraksi yang paling sederhana dan mudah dalam pengerjaannya meskipun volume pelarut yang digunakan cukup banyak dan membutuhkan waktu yang lama jika dibandingkan dengan metode yang lain. Pelarut etanol 80% (campuran alkohol dan air) digunakan karena etanol merupakan pelarut polar yang universal karena mampu melarutkan banyak zat aktif seperti alkaloid basa, minyak atsiri, glikosida, kumarin, kurkumin, antrakinin, flavonoid, steroid, dan klorofil. Keunggulan lain dari bahan pelarut ini adalah memenuhi kriteria cairan pelarut yang baik menurut Peraturan Depkes (Anonim, 1986; Anonim, 2000).

Dari 100 g serbuk didapatkan 9,5 g ekstrak kental sehingga didapatkan nilai rendamen sebesar 9,5%.

B. Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Benalu Teh

Berdasarkan skrining fitokimia yang telah dilakukan maka dapat diketahui kandungan senyawa kimia yang terdapat pada ekstrak daun benalu teh seperti terdapat pada tabel IV.1

Tabel IV.1. Hasil skrining fitokimia ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser)

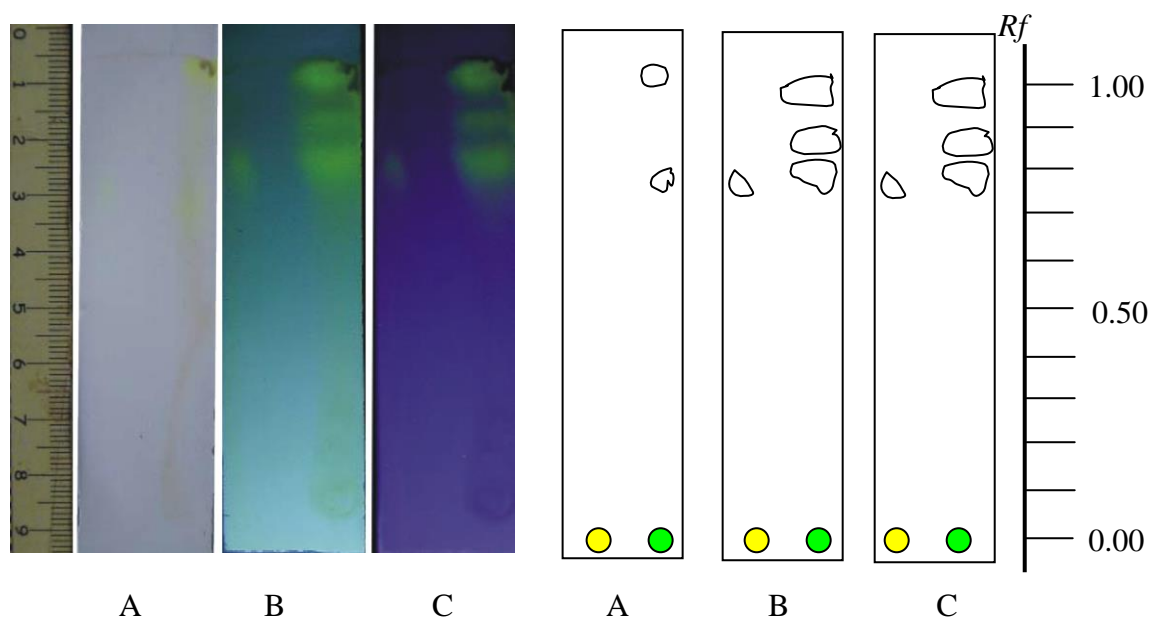
No	Pemeriksaan	Hasil	Keterangan
1.	Alkaloid	-	Tidak mengandung alkaloid
2.	Flavonoid	+	Mengandung flavonoid
3.	Kumarin	-	Tidak mengandung kumarin
4.	Terpenoid/Steroid	+	Mengandung terpenoid
5.	Tanin	+	Mengandung tanin
6.	Saponin	-	Tidak mengandung saponin

Dari hasil skrining fitokimia, diketahui ekstrak daun benalu teh mengandung tanin, flavonoid dan terpenoid. Alkaloid, kumarin, dan saponin menunjukkan hasil yang negatif, hal ini dapat disebabkan karena kadar ketiga senyawa tersebut sangat rendah sehingga tidak terdeteksi oleh pereaksi yang digunakan atau ketiga senyawa tersebut memang tidak disintesis sama sekali dalam sampel yang dianalisis. Hasil positif pada skrining fitokimia dilanjutkan dengan mengamati profil KLT (kromatografi lapis tipis). Kromatografi lapis tipis adalah suatu teknik analisa sederhana yang dimaksudkan untuk mengetahui adanya zat kimia dalam suatu cuplikan.

Pada identifikasi senyawa flavonoid digunakan senyawa pembanding rutin dengan alasan rutin adalah glikosida flavonoid yang sangat umum terdapat dalam tumbuhan, jadi ia merupakan senyawa yang paling mungkin dijumpai sewaktu pemeriksaan. Pada penelitian ini memberikan hasil yang positif yaitu terjadi bercak

warna kuning pada pengamatan sinar tampak dan setelah disemprot dengan pereaksi sitroborat akan berwarna kuning kehijauan berfluoresensi pada saat diamati dibawah lampu UV 365. Warna kuning kehijauan berfluoresensi ini dapat menunjukkan bahwa didalam ekstrak daun benalu teh diduga terdapat senyawa golongan kuersetin. Hasil kromatogram yang diperoleh dapat diamati pada gambar IV.1. dan tabel IV.2.

Identifikasi senyawa terpenoid setelah disemprot dengan Liebermann Burchard memberikan hasil positif dengan penampakan bercak berwarna merah. Hasil kromatogram yang diperoleh dapat diamati pada gambar IV.2 dan tabel IV.3.



Gambar IV.1. Kromatogram hasil KLT identifikasi flavonoid dengan fase diam selulosa dan fase gerak etil asetat:asam format:asam asetat glasial:air (100:11:11:15 v/v) pembanding rutin. Deteksi dengan pereaksi sitroborat

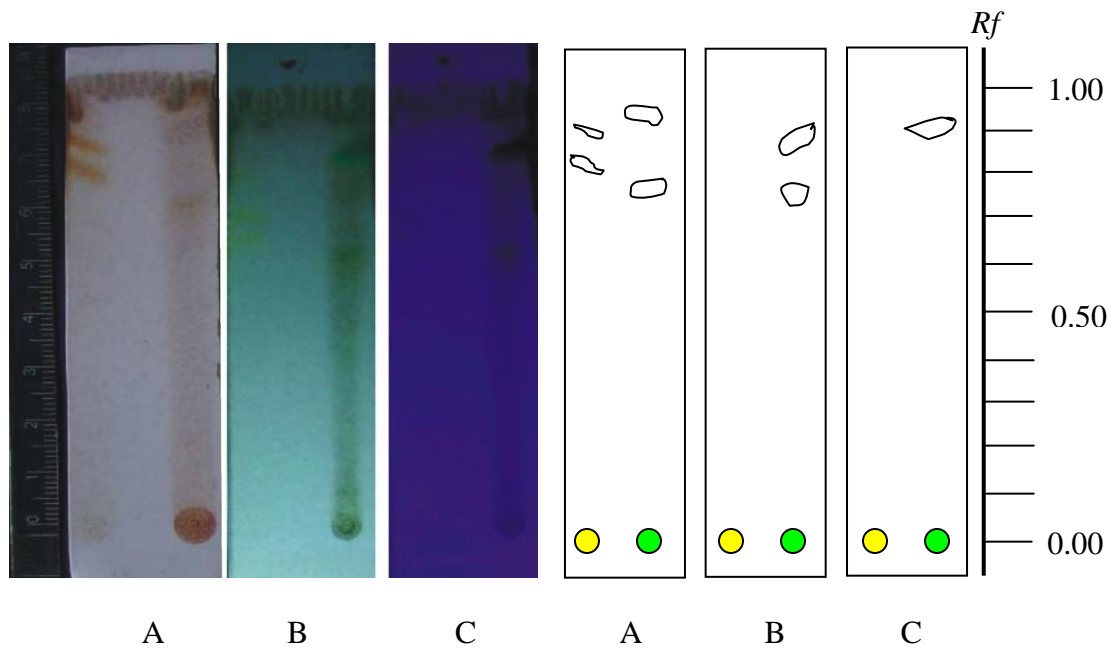
Keterangan :

Totolan disebelah kiri (warna kuning) adalah rutin (pembanding) dan disebelah kanan (warna hijau) adalah ekstrak daun benalu teh

A. Diamati pada sinar tampak setelah disemprot pereaksi sitroborat

B. Diamati pada Sinar UV, $\lambda = 254$ setelah disemprot pereaksi sitroborat

C. Diamati pada Sinar UV, $\lambda = 365$ setelah disemprot pereaksi sitroborat



Gambar IV.2. Kromatogram hasil KLT identifikasi terpenoid dengan silika gel F_{254} dan fase gerak etil asetat:metanol:air (77:15:8 v/v) dan pembanding *Liquiritae radix*. Deteksi dengan pereaksi Liebermann Burchard

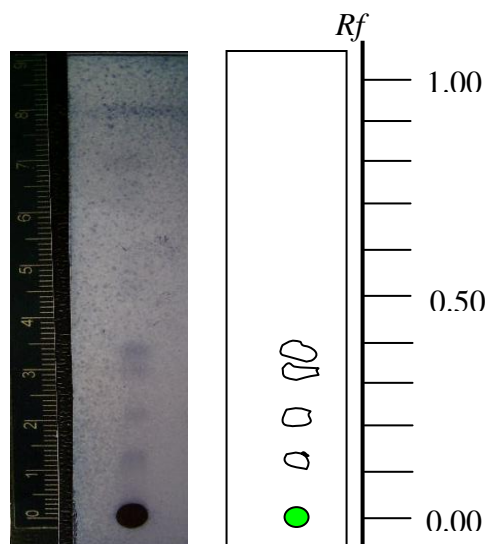
Keterangan :

Totolan disebelah kiri (warna kuning) adalah *Liquiritae radix* (pembanding) dan disebelah kanan (warna hijau) adalah ekstrak daun benalu teh

A. Diamati pada sinar tampak setelah disemprot pereaksi Liebermann Burchard

B. Diamati pada sinar UV, $\lambda = 254$ setelah disemprot pereaksi Liebermann Burchard

C. Diamati pada sinar UV, $\lambda = 365$ setelah disemprot pereaksi Liebermann Burchard



Gambar IV.3. Kromatogram hasil KLT identifikasi minyak atsiri dengan silika gel F_{254} dan fase gerak toluena:etil asetat (93:7 v/v). Deteksi dengan pereaksi vanilin asam sulfat pada sinar tampak.

Pada identifikasi minyak atsiri memberikan hasil yang positif yaitu timbul warna biru setelah disemprot dengan vanilin asam sulfat. Minyak atsiri sesungguhnya merupakan monoterpena dan sesquiterpena, sehingga dapat dikatakan dalam benalu teh terdapat terpenoid.

Bilangan R_f didefinisikan sebagai jarak yang ditempuh oleh senyawa dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh pengembang (fase gerak). Banyaknya bercak (noda) dengan bilangan R_f yang berbeda dapat menggambarkan banyaknya jenis senyawa yang terkandung dalam ekstrak uji. Pada identifikasi flavonoid, terdapat 3 bercak noda pada ekstrak daun benalu teh dan salah satunya sama dengan bercak pada pembanding yaitu rutin. Hal ini menunjukkan dalam daun benalu teh sedikitnya terdapat 3 senyawa flavonoid dan salah satunya diduga rutin. Pada identifikasi terpenoid dan minyak atsiri, masing-masing terdapat 2 dan 4 bercak noda sehingga dapat dikatakan sedikitnya terdapat 6 jenis kandungan senyawa golongan terpenoid pada daun benalu teh.

Tabel IV.2. Harga R_f hasil identifikasi senyawa golongan flavonoid ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser)

No Bercak	Harga R_f		Warna		
	Ekstrak etanol	Pembanding	Visibel	UV λ 254 nm	UV λ 365 nm
1	0,75	0,75	Kuning	Pemadaman	Flouresensi Kuning Kehijauan
2	0,88		Kuning	Pemadaman	Flouresensi Kuning Kehijauan
3	1		Kuning	Pemadaman	Flouresensi Kuning Kehijauan

Tabel IV.3. Harga R_f hasil identifikasi senyawa golongan terpenoid ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser)

No Bercak	Harga R_f		Warna		
	Ekstrak etanol	Pembanding	Visibel	UV λ 254 nm	UV λ 365 nm
1.	0,75	0,85	Coklat	Pemadaman	Pemadaman
2.	1	0,91	Coklat	Pemadaman	Pemadaman

Tabel IV.4. Harga R_f hasil identifikasi senyawa golongan minyak atsiri ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser)

No Bercak	Harga R_f ekstrak	Warna Pada Sinar Tampak
1	0,13	Biru ungu
2	0,25	Biru ungu
3	0,38	Biru ungu
4	0,44	Biru ungu

C. Uji toksisitas

Uji BST dilakukan untuk mengetahui toksisitas ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser). Pelarut yang digunakan untuk melarutkan ekstrak etanol daun benalu teh adalah DMSO (dimetilsulfoksida). DMSO dipilih karena merupakan pelarut yang secara rutin digunakan dalam penelitian in vitro, dapat bercampur dengan air dan merupakan pelarut yang baik untuk ion anorganik maupun senyawa organik (Freshney, 2000). Kontrol diperlukan untuk mengoreksi adanya kemungkinan efek yang timbul yang disebabkan dari pelarut.

Pada kontrol dan kontrol pelarut didapatkan hasil 100% larva hidup sehingga koreksinya dapat diabaikan pada perhitungan persen kematian. Hasil perhitungan nilai LC_{50} dari ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) dengan menggunakan analisis probit dapat dilihat pada tabel IV.5.

Tabel IV.5. Data hasil uji BST ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser).

No.	Konsentrasi µg/ml	Jumlah total larva	Jumlah larva yang mati	% kematian	Log Konsentrasi (X)	A.Probit (Y)
1.	25	60	25	42	1,39	4,80
2	50	60	31	52	1,69	5,05
3.	75	60	40	67	1,87	5,44
4.	100	60	43	72	2	5,58
5.	200	60	50	80	2.30	5,84

Dengan rumus $Y = A + Bx$ (Finney, 1971) dari hasil perhitungan diatas maka didapat :

$$5 = 3,1113 + 1,2058X$$

$$x = 1,5663 \rightarrow \text{antilog} = 36,84$$

harga R adalah 0,9849 dan harga LC_{50} adalah 36,84 µg/ml.

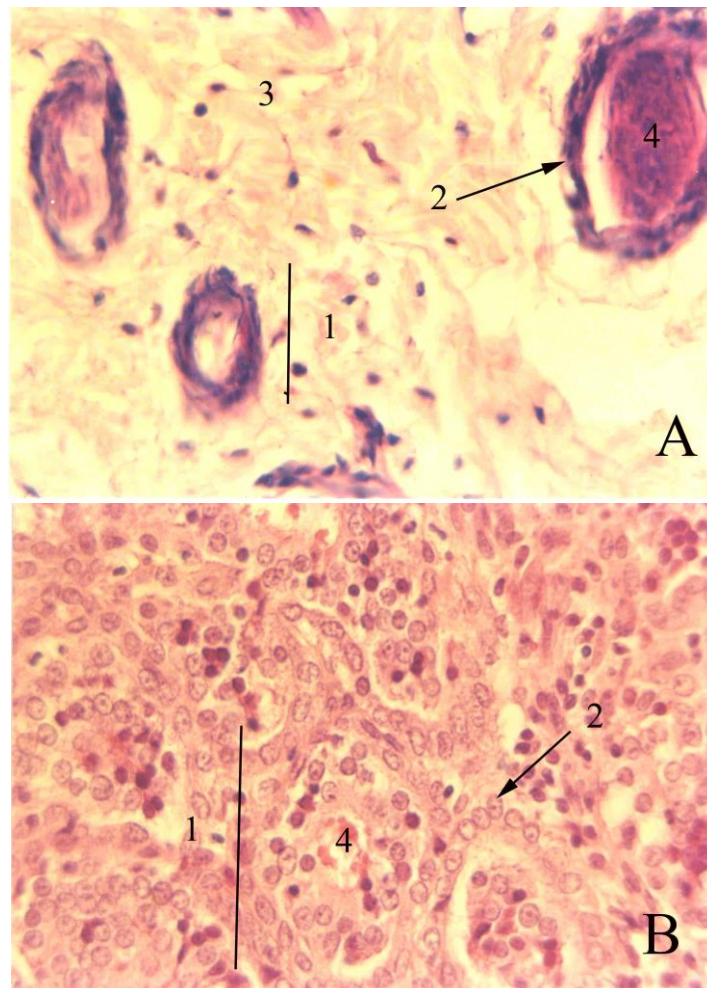
Harga LC_{50} menunjukkan konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% pada hewan uji. Semakin besar harga LC_{50} maka toksisitas semakin kecil dan semakin kecil harga LC_{50} maka toksisitasnya semakin besar. Jika harga $LC_{50} < 1000$ µg/ml dikatakan toksik sebaliknya jika harga $LC_{50} > 1000$ µg/ml dikatakan tidak toksik (Meyer, *et. al.*, 1982). Hasil perhitungan menunjukkan harga LC_{50} ekstrak daun benalu teh adalah 36,84 µg/ml sehingga dapat dikatakan bersifat toksik Untuk selanjutnya harga LC_{50} ini digunakan untuk uji angiogenesis dengan pembulatan untuk mempermudah pengukuran yaitu 40 µg/ml.

D. Induksi Karsinogenesis

Pembuatan tumor payudara ini berdasarkan pada metode Singletary, *et al.* (1998) dan Susilowati (2004) yang telah dimodifikasi yaitu menggunakan bahan penginduksi DMBA (7,12-dimethyl-1,2-Benzanthracene) dengan dosis 20 mg/kg BB, selama 12 kali pemberian

Dari hasil penelitian, timbulnya nodul pada setiap tikus tidak sama. Nodul mulai timbul antara minggu ke 3 sampai minggu ke 20 setelah perlakuan, hal ini disebabkan oleh kepekaan masing-masing tikus berbeda. Pada tiap tikus hanya terdapat 1 nodul dan letaknya bervariasi dapat pada daerah payudara bagian cranial, median, atau caudal.

Pada penelitian ini, nodul tumor yang digunakan untuk implantasi pada uji angiogenesis adalah nodul yang berumur 7 minggu karena diperkirakan nodul pada umur ini sel-selnya sudah mensekresi TAF, sehingga dapat menginduksi angiogenesis dengan optimal. Nodul yang berumur 8 minggu sel-selnya sudah bernanah sehingga kemungkinan terjadi kontaminasi lebih besar. Gambaran mikroskopik jaringan payudara pada tikus dapat dilihat pada Gambar IV.4.



Gambar IV.4. Gambaran mikroskopis payudara tikus (*Rattus novergicus* L.), pewarnaan HE, perbesaran lensa okuler 10 x objektif 40

Keterangan:

A. Jaringan Normal

B. Jaringan tumor umur 7 minggu akibat induksi DMBA

1. *Acinus*

3. Jaringan ikat

2. Sel epitel

4. Lumen

Pada gambaran mikroskopis dengan pewarnaan HE, pada jaringan payudara yang normal terlihat adanya *acinus* yang tersusun dari selapis sel epitelial, pada bagian tengah terdapat lumen yang luas. *Acini-acini* tersebut terletak diantara jaringan ikat. Pada jaringan tumor berumur 7 minggu sel epitelial ini sudah mengalami proliferasi menjadi beberapa lapis sel yang menyebabkan lumen menjadi

semakin sempit dan mendesak jaringan ikat. Berdasarkan hasil analisis patologi disimpulkan adanya adenokarsinoma mammae yaitu tumor ganas yang berasal dari epitel kelenjar mammae (lampiran 2).

E. Uji Angiogenesis

Pada penelitian ini uji angiogenesis pada membran korio alantois (MKA) dilakukan untuk melihat pengaruh ekstrak daun benalu teh terhadap angiogenesis akibat implantasi tumor payudara tikus yang terinduksi DMBA. Ekstrak daun benalu teh dilarutkan dalam DMSO. DMSO ini merupakan pelarut yang sangat kuat karena dapat membantu sampel uji untuk berpenetrasi ke dalam pembuluh darah melalui kulit dan membran (Freshney, 2000).

1. Pengamatan makroskopis

Hasil yang diperoleh dari uji angiogenesis tertera pada tabel IV.5 dan gambar IV. 5 – IV.6.

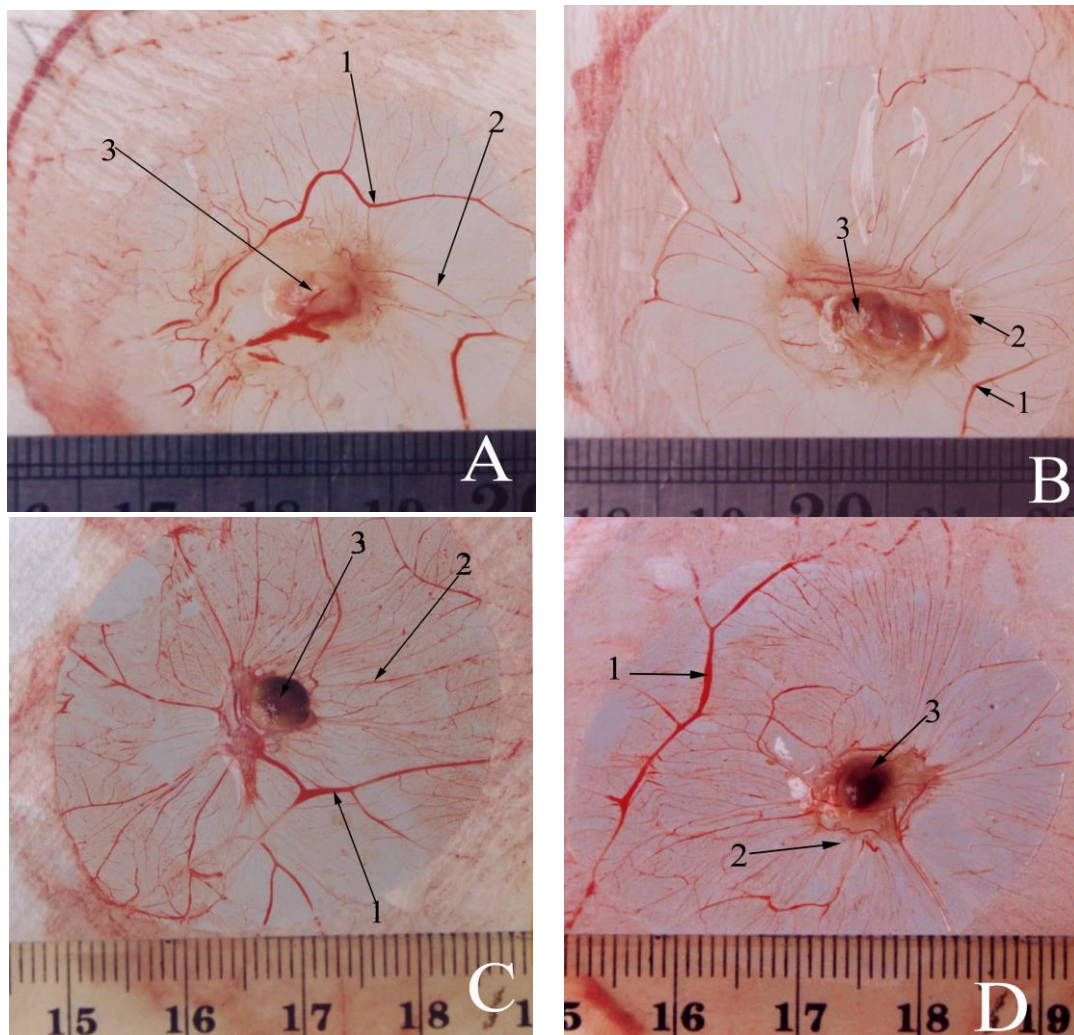
Tabel IV.5. Respon angiogenesis pada MKA setelah pemberian ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser)

No	Perlakuan	Rata-Rata Jumlah Pembuluh Darah Baru	Rata-Rata Pertumbuhan Angiogenesis (%)	Rata-Rata Penghambatan Angiogenesis (%)
1.	Implan payudara normal	3,4	8,29	91,71 ^a
2.	Implan payudara normal+DMSO	3,8	9,27	90,73 ^a
3.	Implan tumor payudara	41	100	0 ^b
4.	Implan tumor payudara +DMSO	38,4	93,66	6,34 ^a
5.	Implan tumor + ekstrak 40 µg/ml	31	75,61	24,39 ^a
6.	Implan tumor + ekstrak 80 µg/ml	27,8	67,81	32,19 ^a
7.	Implan tumor+ekstrak 120 µg/ml	20	48,78	51,22 ^a
8.	Implan tumor+ekstrak 160 µg/ml	6,8	16,59	83,41 ^{a*}

Keterangan : a = berbeda bermakna dengan kelompok kontrol kanker

* = berbeda bermakna antar kelompok dosis

Berbeda bermakna pada $p < 0,05$

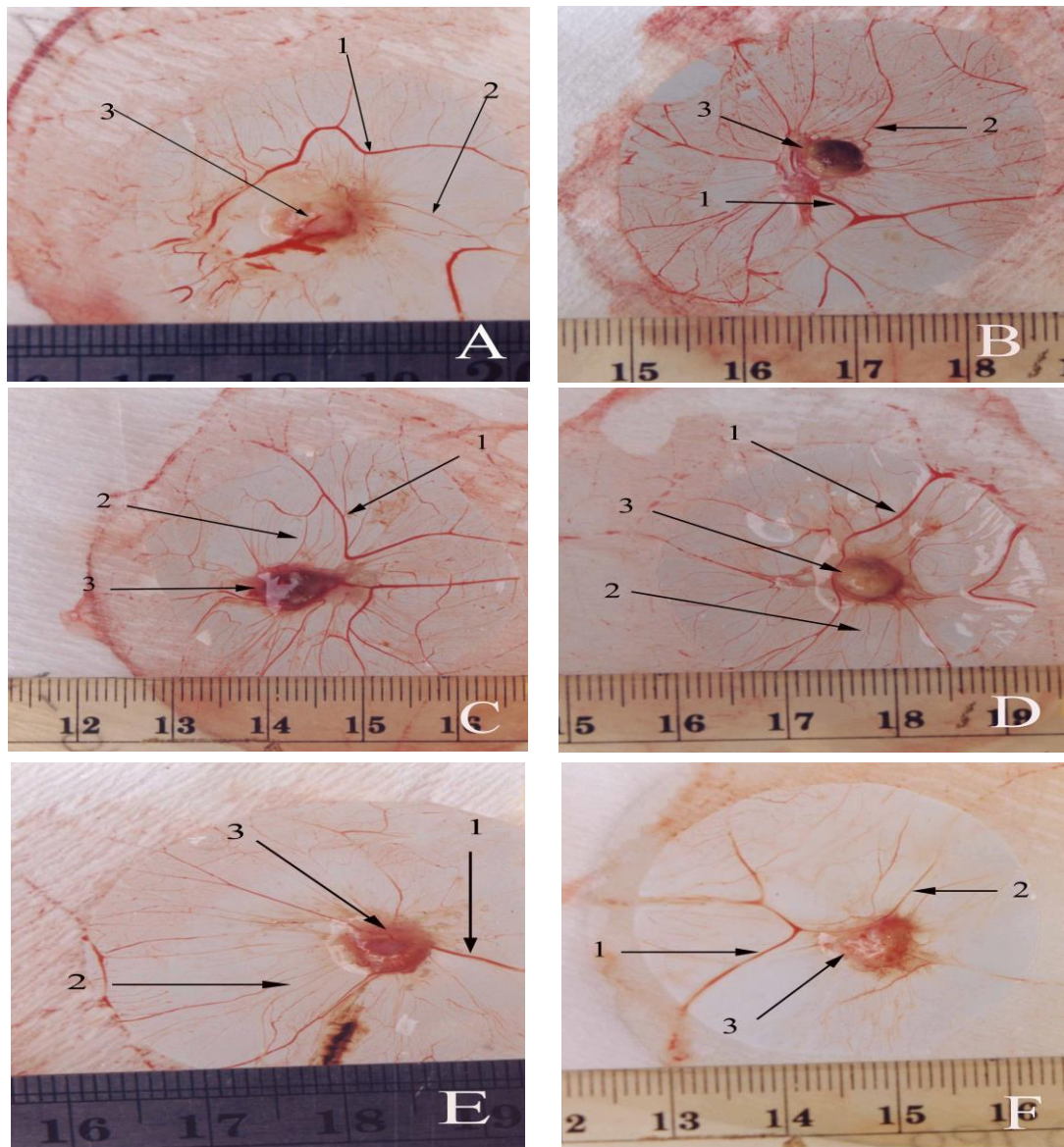


Gambar IV.5 Gambaran makroskopis respon angiogenesis pada MKA 72 jam setelah implantasi jaringan payudara normal dan tumor payudara

Keterangan:

- A. MKA dengan implan jaringan normal
- B. MKA dengan implan jaringan normal dan pelarut
- C. MKA dengan implan jaringan tumor
- D. MKA dengan implan jaringan tumor dan pelarut

- 1. Pembuluh darah utama
- 2. Pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang sudah ada
- 3. Implan



Gambar IV.6 Gambaran makroskopis respon angiogenesis pada MKA 72 jam setelah implantasi jaringan payudara normal, tumor payudara dan pemberian ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser)

Keterangan :

- A. MKA dengan implan jaringan normal
- B. MKA dengan implan jaringan tumor
- C. MKA dengan implan jaringan tumor + ekstrak 40 µg/ml
- D. MKA dengan implan jaringan tumor + ekstrak 80 µg/ml
- E. MKA dengan implan jaringan tumor + ekstrak 120 µg/ml
- F. MKA dengan implan jaringan tumor + ekstrak 160 µg/ml

- 1. Pembuluh darah utama
- 2. Pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang sudah ada
- 3. Implan

Data dianalisis dengan menggunakan analisis statistik non parametrik Kruskal Wallis dan dilanjutkan dengan uji Mann Whitney untuk melihat beda antara tiap perlakuan. Analisis statistik non parametrik digunakan karena data yang diperoleh dalam bentuk prosentase.

Dari analisis statistik (Lampiran 8) didapatkan hasil bahwa tidak terdapat beda nyata antara kelompok implan jaringan payudara normal dengan implan jaringan payudara normal dan DMSO serta antara kelompok implan jaringan tumor payudara dengan implan jaringan tumor payudara dan DMSO (Gambar IV.5 A-B dan Gambar IV.5 C-D). Hal ini berarti pelarut yang digunakan (DMSO) tidak memberikan efek angiogenik ataupun antiangiogenik baik pada sel normal maupun sel kanker.

Pada MKA dengan implan jaringan payudara normal (Gambar IV.5 A-B) tetap terjadi proses pembentukan pembuluh darah baru meskipun sedikit tetapi tidak menuju ke jaringan implan. Hal ini menunjukkan adanya pembentukan pembuluh darah baru yang normal pada MKA dan tidak disebabkan oleh induksi implan jaringan normal sebagai angiogenik faktor. Pembentukan dinding pembuluh darah baru ini berasal dari sel-sel fibroblas pada MKA dan disebut proses vaskulogenesis.

Pada MKA dengan implan jaringan tumor respon angiogenesis sangat jelas terlihat yaitu dengan terbentuknya pembuluh darah baru (angiogenesis) yang sangat banyak disekitar jaringan implan yang menuju ke arah implan. Hal ini menunjukkan jaringan tumor yang diimplantasi pada MKA mengeluarkan TAF yang dapat menginduksi proses angiogenesis (Gambar. IV.5 C-D). Pembentukan dinding pembuluh darah baru pada angiogenesis ini berasal dari sel-sel endotelium dari pembuluh darah utama pada MKA.

Pada MKA dengan implan jaringan tumor payudara yang telah diberi berbagai konsentrasi ekstrak daun benalu teh secara visual dapat memberikan efek antiangiogenesis dengan penurunan jumlah pembuluh darah angiogenesis. Semakin besar konsentrasi ekstrak, jumlah pembuluh darah angiogenesis yang terbentuk semakin sedikit (Gambar IV. 6 B-F)

Berdasarkan perhitungan statistik dengan uji Mann-Whitney maka diketahui bahwa antara ekstrak daun benalu teh dosis 40 µg/ml dengan 80 µg/ml dan antara 80 µg/ml dengan 120 µg/ml tidak berbeda nyata secara statistik. Antara dosis 120 µg/ml dan 160 µg/ml terdapat beda nyata. Hal ini menunjukkan bahwa dosis ekstrak daun benalu teh di bawah 160 µg/ml tidak memberikan efek antiangiogenesis. Dosis ekstrak yang dapat memberikan efek antiangiogenesis adalah dosis 160 µg/ml.

Ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) diduga dapat menghambat proses angiogenesis pada membran korio alantois yang telah diimplantasi dengan jaringan tumor payudara tikus. Penghambatan angiogenesis oleh ekstrak ini disebabkan oleh kandungan senyawa kimia yang ada dalam daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser).

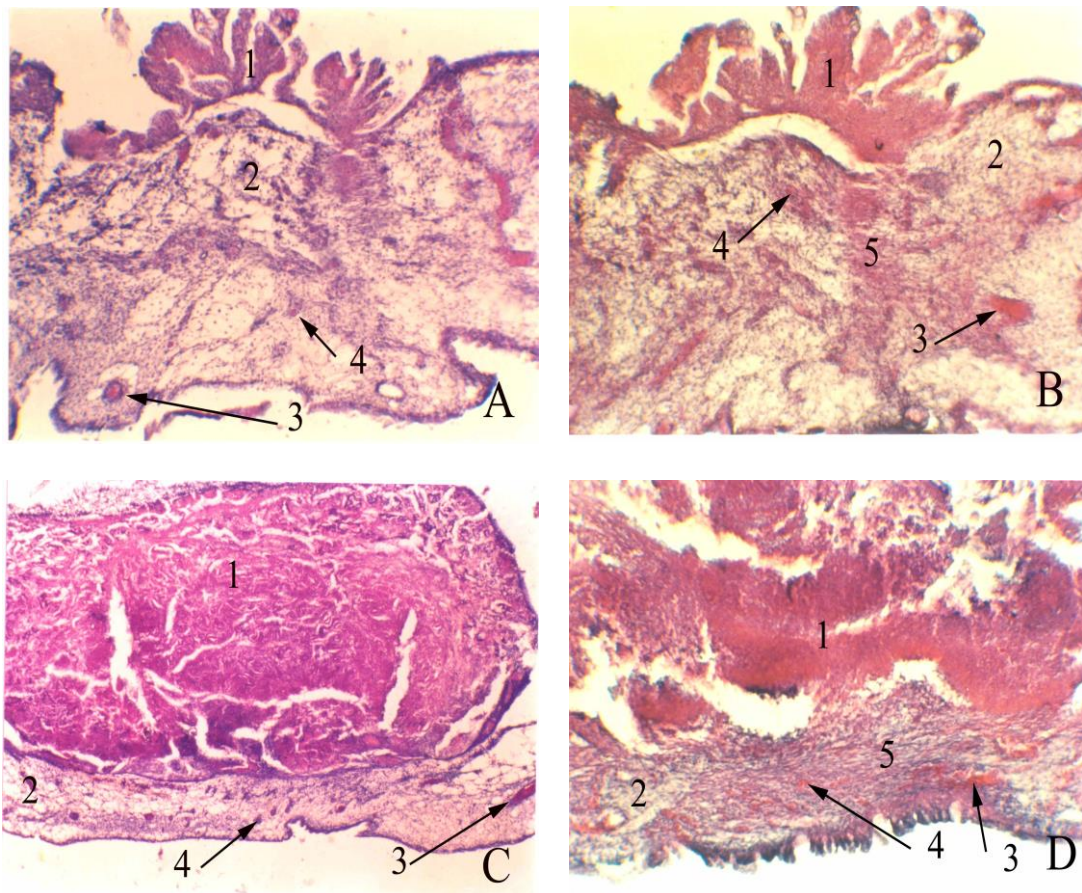
Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa pemberian ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) mampu menghambat angiogenesis pada MKA embrio ayam terinduksi tumor payudara tikus. Efek penghambatan angiogenesis oleh ekstrak daun benalu teh dimulai pada dosis 160 µg/ml. Senyawa golongan flavonoid dan terpenoid yang terkandung dalam daun benalu teh diduga mampu menghambat angiogenesis.

2. Pengamatan mikroskopis

Tujuan pembuatan preparat histologis ini adalah untuk melihat struktur histologis membran korio alantois (MKA) embrio ayam beserta implan. Secara umum terbentuk batas yang jelas antara jaringan implan dan jaringan hospes (MKA). MKA tersusun oleh jaringan ikat longgar yang didominasi oleh sel fibroblas atau sel yang bersifat mesenkimal. Dinding pembuluh darah terdiri dari sel-sel endotelium.

Pada MKA yang diimplantasi jaringan payudara normal, tidak terbentuk respon angiogenesis sehingga pada MKA tidak tampak adanya pembuluh darah baru yang berasal dari pembuluh darah yang telah ada. Hal ini disebabkan implan payudara normal tidak menghasilkan TAF yang akan menginduksi terjadinya angiogenesis. Pembuluh darah yang tampak pada membran tersebut merupakan pembuluh darah utama (vaskulogenesis) pada embrio ayam (Gambar IV.7 A-B).

Pada kelompok perlakuan dengan pelarut DMSO (Gambar IV.7 B-D) terlihat adanya serabut-serabut kolagen pada MKA yang ditunjukkan oleh warna merah pada pewarnaan HE. Pada MKA dengan implan jaringan tumor payudara, serabut kolagen yang terbentuk lebih banyak daripada implan jaringan payudara normal, hal ini terlihat pada MKA implan jaringan tumor payudara tampak lebih memadat. Hal ini menunjukkan bahwa pelarut DMSO dapat merangsang sintesa kolagen pada MKA.

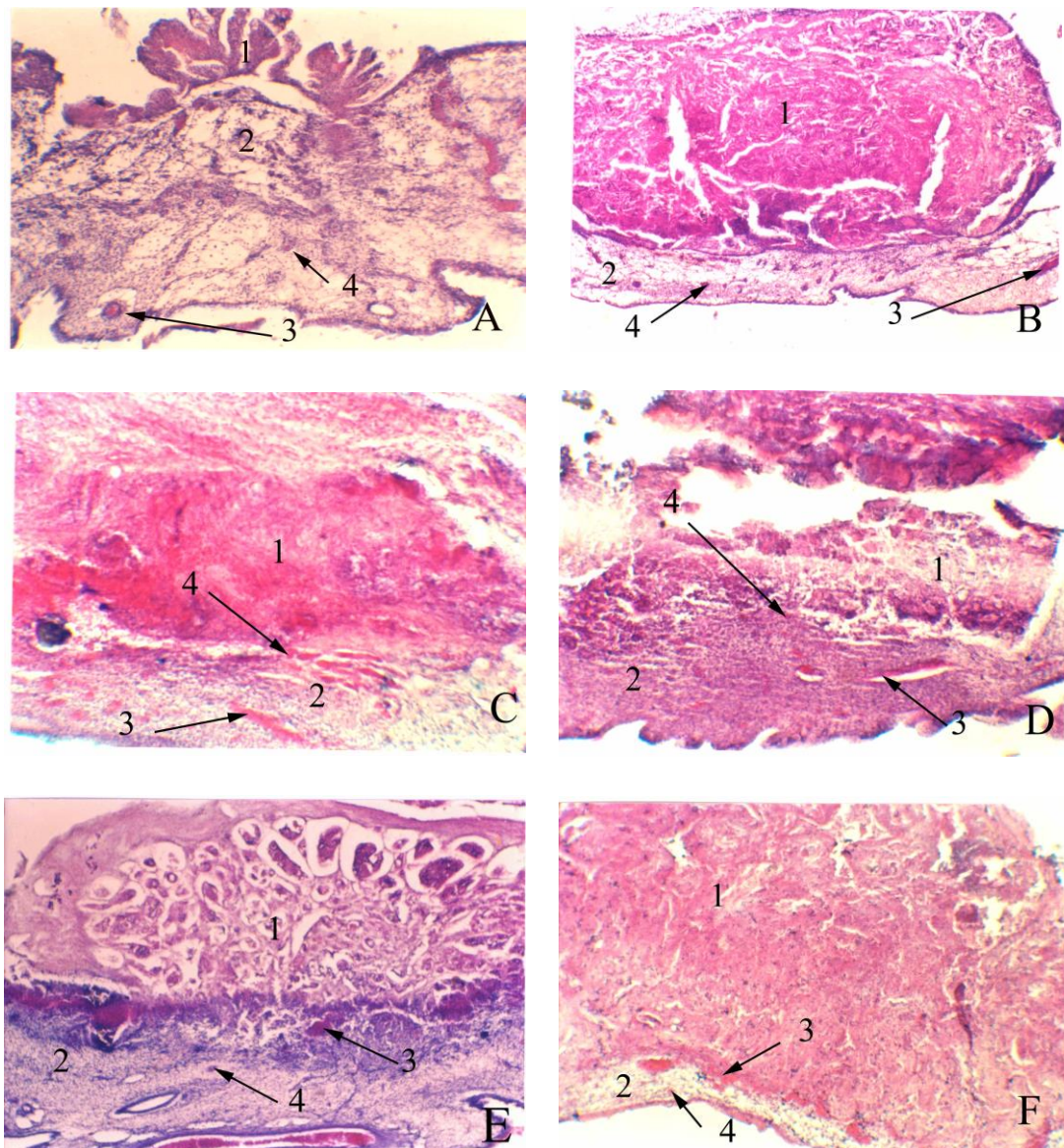


Gambar IV.7. Gambaran mikroskopis respon angiogenesis pada MKA 72 jam setelah implantasi jaringan payudara normal dan tumor payudara, pewarnaan HE, perbesaran lensa okuler 10 x objektif 40

Keterangan :

- A. MKA + implan jaringan payudara normal
- B. MKA + implan jaringan payudara normal dan pelarut DMSO
- C. MKA + implan jaringan tumor payudara
- D. MKA + implan jaringan tumor payudara dan pelarut DMSO

- 1. Implan
- 2. Membran korio alantois
- 3. Pembuluh darah utama
- 4. Pembuluh darah baru
- 5. Serabut kolagen



Gambar IV.8. Gambaran mikroskopis respon angiogenesis pada MKA 72 jam setelah implantasi jaringan payudara normal, tumor payudara dan pemberian ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser), pewarnaan HE, perbesaran lensa okuler 10 x objektif 40

Keterangan :

- A. MKA + implan jaringan payudara normal
- B. MKA + implan jaringan tumor payudara
- C. MKA + implan jaringan tumor payudara + ekstrak daun benalu teh 40 µl/ml
- D. MKA + implan jaringan tumor payudara + ekstrak daun benalu teh 80 µl/ml
- E. MKA + implan jaringan tumor payudara + ekstrak daun benalu teh 120 µl/ml
- F. MKA + implan jaringan tumor payudara + ekstrak daun benalu teh 160 µl/ml

1. Implan
3. Pembuluh darah utama

2. Membran korio alantois
4. Pembuluh darah baru

Pada MKA yang diimplantasi jaringan tumor payudara tampak adanya respon angiogenesis. Pembentukan pembuluh darah baru yang ukurannya lebih kecil dibandingkan dengan pembuluh darah utama, tampak pada jaringan MKA di dekat perbatasan dengan jaringan implan. Selain itu MKA yang diimplantasi jaringan tumor payudara, tampak lebih padat jika dibandingkan dengan MKA yang diimplantasi jaringan payudara normal. Hal ini menunjukkan adanya proliferasi sel-sel mesenkhimal pada MKA akibat adanya TAF yang dikeluarkan oleh jaringan tumor.

Pada MKA yang diimplantasi jaringan tumor payudara jumlah pembuluh darah baru yang terbentuk semakin menurun dengan adanya peningkatan dosis ekstrak daun benalu teh jika dibandingkan dengan kontrol pada MKA yang diimplantasi jaringan tumor payudara (Gambar IV.8. B-F). Hal ini menunjukkan adanya penghambatan proses angiogenesis oleh ekstrak daun benalu teh.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan data kuantitatif dan kualitatif yang telah dikumpulkan maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) dapat menghambat angiogenesis pada membran korio alantois embrio ayam setelah implantasi tumor payudara tikus (*Rattus novergicus* L.)
2. Dosis ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) sebagai penghambatan angiogenesis adalah 160 µg/ml.
3. Kandungan kimia yang terdapat dalam ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) yang diduga berperan dalam menghambat angiogenesis adalah senyawa golongan flavonoid dan terpenoid.

B. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai analisa bahan aktif yang terkandung dalam ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) yang dapat menghambat angiogenesis akibat implantasi tumor payudara, sehingga dapat diketahui dengan pasti bahan aktif yang paling berperan sebagai antiangiogenesis.

Efek antiangiogenesis ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) perlu diteliti lebih lanjut dengan memperbanyak variasi dosis maupun sampel sehingga akan didapatkan data yang lebih akurat mengenai ketoksikan

ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser). Selain itu, perlu dilakukan uji antiangiogenesis terhadap kanker yang lain.

RINGKASAN

Kanker payudara adalah penyakit kanker kedua yang banyak dialami oleh penduduk wanita Indonesia setelah kanker mulut rahim. Pengobatan kanker secara medis yang selama ini dilakukan belum banyak memberikan hasil yang sempurna, sehingga orang mulai berpikir pada pengobatan alternatif dengan menggunakan bahan alami (*natural product*) yang aman, bermanfaat, mudah dalam pelaksanaan, murah, dan didasari penelitian ilmiah yang mendalam (Saputra, 2003).

Pengobatan kanker dengan bahan alami ini bertujuan untuk meningkatkan daya tahan tubuh (*immunoterapi*) dan menghambat pembentukan kapiler darah kanker (*angiogenesis inhibition*) (Saputra, 2003). Terapi menggunakan *inhibitor angiogenesis* adalah suatu pendekatan yang relatif baru untuk terapi tumor/kanker. Angiogenesis adalah proses pembentukan pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang sudah ada (Kerbel, 2000, Cristofanilli, 2002).

Benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) merupakan salah satu tumbuhan yang hidup sebagai parasit pada pohon teh (*Camellia sinensis* L.). Tumbuhan ini secara empiris digunakan oleh masyarakat sebagai obat antikanker (Anonim, 2003b). Benalu teh mengandung saponin, tanin, alkaloid dan flavonoid (Anonim, 1997). Menurut Hegnauer (1966) benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) mengandung kuersetin dan melissylalkohol. Manfaat dari benalu teh ini antara lain sebagai obat antiradang, hipertensi, sakit kuning, dan obat kanker (Anonim, 1997, Anonim 2003b).

Tumor adalah suatu penyakit yang sel-selnya menunjukkan ciri yang berbeda dengan sel normal. Sel-sel tumor dapat berproliferasi secara tak terkendali. Sel tumor akan terus membelah dan akan tumbuh menyusup ke jaringan disekitarnya (invasif) lalu membuat anak sebar (metastasis) (Cotran *et al.*, 1994).

Salah satu faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan penyebaran tumor adalah angiogenesis. Angiogenesis adalah pembentukan kapiler darah baru dari pembuluh darah yang telah ada (neovaskularisasi). Angiogenesis biasanya terjadi selama masa perkembangan embrional dan selama proses fisiologi yang lain seperti penyembuhan luka. Pada pertumbuhan tumor, angiogenesis dipengaruhi oleh faktor-faktor yang dihasilkan oleh sel tumor yang disebut TAF (*Tumour Angiogenesis Factor*). Difusi oksigen dan makanan dari pembuluh darah hanya sampai pada daerah sejauh 1-2 mm dari pembuluh darah, maka pembesaran tumor tergantung kepada bertambahnya jumlah pembuluh darah untuk pasokan darah. Oleh karena peran angiogenesis yang penting pada pertumbuhan dan penyebaran sel tumor ini maka zat (agensia) yang dapat menghambat angiogenesis merupakan hal yang penting bagi pengobatan tumor (Cotran *et al.*, 1994; Kerbel, 2000).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) terhadap angiogenesis pada membran korio alantois setelah implantasi tumor payudara tikus (*Rattus norvegicus* L.) dan untuk mengetahui dosis terapeutik ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) dalam menghambat angiogenesis serta untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) yang diduga berperan dalam penghambatan angiogenesis.

Pada penelitian ini, daun benalu teh dimaserasi dengan menggunakan etanol 80%. Ekstrak kemudian dianalisa kandungan kimianya dengan kromatografi lapis tipis. Uji toksisitas untuk mendapatkan harga LC_{50} dilakukan dengan metode BST (*Brine Shrimp Lethality Test*). Kontrol DMSO digunakan sebagai kontrol pelarut senyawa uji. Jumlah larva *A. salina* yang mati setelah 24 jam perlakuan dihitung dan dinalisis dengan analisis probit.

Tahap induksi karsinogenesis dilakukan pada tikus betina (*Rattus norvegicus* L) yang diinduksi DMBA (7,12-Dimetilbenz[a]anthracene) per-oral dengan 12 kali pemberian selama 6 minggu untuk mendapatkan jaringan tumor yang akan diimplantasikan pada membran korio alantois embrio ayam. Palpasi nodul dilakukan setiap minggu setelah induksi hingga didapatkan nodul tumor payudara yang berumur 7 minggu.

Pada tahap uji antiangiogenesis dengan metoda membran korio alantois (MKA) digunakan 40 butir telur ayam berembrio umur 9 hari dibagi menjadi 8 kelompok. Empat kelompok kontrol yaitu kelompok kontrol implan jaringan payudara normal, implan jaringan payudara normal dan pelarut DMSO, implan jaringan tumor payudara, implan jaringan tumor payudara dan pelarut DMSO. Pada kelompok perlakuan, terbagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok implan jaringan tumor payudara ditambah ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser. Variasi konsentrasi ekstrak daun benalu teh yang digunakan adalah 40 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, 120 $\mu\text{g/ml}$ dan 160 $\mu\text{g/ml}$. Parameter yang diukur adalah pertambahan jumlah kapiler darah baru yang terbentuk setelah 72 jam implantasi.

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik non parametrik dengan Kruskal Wallis Test dan dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney.

Dari analisis kandungan kimia diketahui bahwa ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) mengandung tannin, terpenoid dan flavonoid. Hasil perhitungan menunjukkan harga LC_{50} ekstrak daun benalu teh adalah 36,84 $\mu\text{g/ml}$ sehingga dapat dikatakan bersifat toksik karena harga $LC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$ (Meyer, *et. al.*, 1982).

Pada induksi karsinogenesis dengan DMBA, nodul mulai terbentuk pada minggu ke 3 setelah induksi. Nodul yang akan diimplantasikan pada membran korio alantois embrio ayam adalah nodul yang berumur 7 minggu.

Respon angiogenesis pada MKA embrio ayam setelah implantasi tumor payudara tikus dipakai untuk mengevaluasi kemampuan ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) dalam menghambat angiogenesis. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) pada konsentrasi 160 $\mu\text{g/ml}$ mampu menghambat angiogenesis pada membran korio alantois embrio ayam setelah implantasi tumor payudara tikus (*Rattus norvegicus* L.).

Dari hasil penelitian tersebut diatas maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun benalu teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser) dapat menghambat angiogenesis implan tumor payudara tikus terinduksi DMBA. Kandungan kimia yang diduga mampu menghambat angiogenesis adalah senyawa golongan flavonoid dan terpenoid.

DAFTAR PUSTAKA

- Albert, B., A. Johnson, M. Raff, K. Roberts and P. Walter, 2002, *Molecular Biology of The Cell*, Fourth Ed, Garland Science, New York, pp 983-987, 1323-1326.
- Anonim, 1986, *Sediaan Galenik*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, hal 1-16.
- Anonim, 1987, *Analisa Obat Tradisional*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, hal 48-52.
- Anonim, 1995, *Farmakope Indonesia*, Edisi ke-4, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, hal. 7-9, 1043-1044.
- Anonim, 1997, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia (IV)*, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, hal 167-168.
- Anonim, 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Cetakan Pertama, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal 3-12.
- Anonim, 2000, *Understanding Angiogenesis*, The Angiogenesis Foundation Inc. <http://www.angio.org/understanding/understanding.html>, 20m Maret 2005.
- Anonim, 2003a, *Kanker Penyebab Kematian Keenam Terbesar di Indonesia*, Media Indonesia. Jakarta.
- Anonim, 2003b, *Obat Tradisional Taklukan Kanker*, Seri Pengalaman, Penebar Swadaya, Jakarta, hal 15-17.
- Anonim, 2004, *Benign Breast Disease ang Breast Cancer Tutorial*, <http://www.wisc.edu/wolberg/breast.htm>, 20 Maret 2005.
- Bancroft J.D and Cook, H.C., 1984, *Manual of Histological Techniques*, Churchill Livingstone, London.
- Buddingh, G.J., [n.a], *Chick-Embrryo Technics*, J.B. Lippicott Company, Philadelphia, pp 109-123.
- Cotran, R.S., V. Kumar, and S. L. Robbins, 1994, *Pathologic Basis of Disease*, 5th Edition, WB Saunders Company, Philadelphia, pp 241-252, 272-279.

- Cristofanilli, M., C. Charnsangavej and G.N. Hortobagyi, 2002, Angiogenesis Modulation In Cancer Research: Novel Clinical Approaches, *Nature Review* Vol. 1, 415-425.
- Donatus, I. A., 2005, *Toksikologi Dasar*, Edisi 2, Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, hal 167-175, 187-188.
- Ebadi, M., 2002, *Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine*, CRC Press London, pp 393 - 403
- Ferrara, N., and K. Alitalo, 1999, Clinical Application of Angiogenic Growth Factors and Their Inhibitors, *Nature Medicine*, Vol 5 No. 12, pp 1359-1364.
- Finney, D.J., 1971, *Probit Analysis*, Third edition, Cambridge at The University Press, p 210.
- Folkman, J., 1996, Fighting Cancer by Attacking Its Blood Supply, *Scientific American*, pp 116-119.
- Fotsis, T, M.S. Pepper, E. Aktas, S. Breit, S. Rasku, H. Adlercreutz, K. Wahala, R. Montesano and L. Schweigerer, 1997, Flavonoids, Dietary-derived Inhibitors of Cell Prolifertion and in Vitro Angiogenesis, *Cancer Research*, Vol 57, Issue 14, pp 2916-2921.
- Freshney, R.I., 2000, *Culture of Animal Cell, A Manual of Basic Technique*, A John Willey and Sons, Inc., Publication, New York, pp 71, 262, 299.
- Harborne, J.B, 1996, *Metoda Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*, Diterjemahkan oleh K. Padmawinata dan I. Soediro, Edisi kedua, Penerbit ITB Bandung, hal. 4-15, 47-108, 123-157.
- Hegnauer, R., 1966, *Chemotaxonomie Der Pflanzen*, Band 4, Birkhauser Verlag Basel Und Stuttgart, p. 431.
- Hodgson, E. and P.E. Levi, 2000, *Chronic Toxicity: Carcinogenesis, Mutagenesis, Teratogenesis* dalam A Text Book Modern Toxicology, 2nd edition, Mc Graw Hill, Boston, pp 171-181.
- Holland, J.F. and Frei, E., 1982, *Cancer Medicine*, Lea and Febiger, Philadelphia, pp 2039-2047.
- Iurlaro, M., A. Vacca, M. Minischetti, D. Ribatti, A. Pellegrino, A. Sardanelli, F. Glacchetta and F. Dammacco, 1998, Antiangiogenesis by Cyclosporin, *Experimental Hematology* 26: 1215-1222.

- Jones, M.K, H. Wang, B.M. Peskar, E. Levin, R.M. Itani, I.J. Sarfeh and A.S. Tarnawski, 1999, Inhibition of Angiogenesis by Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs: Insight into Mechanims and Implications for Cancer Growth ang Ulcer Healing, *Nature Medicine*, Vol 5, No. 12, pp 1418-1422.
- Kerbel, R., and J. Folkman, 2002, Clinical Translation of Angiogenesis Inhibitors, *Nature Review*, Vol 2, pp 727-739.
- Kerbel, R.S., 2000, Tumor Angiogenesis: Past, Present and the Near Future, *Carcinogenesis* Vol 21, No. 3, pp 505-515.
- King, R.J.B, 2000, *Cancer Biology*, Second Edition, Pearson Education, pp 31-37, 96-100, 228-231.
- Klassen, C.D. and Eaton, D.L., 1991, *Principles of Toxicology* dalam Toxicology The Basic Science of Poison, 4th edition, pp12-20, 31-34.
- Knighton, D., D. Ausprunk, D. Tapper and J. Folkman, 1977, Avascular and Vascular Phases of Tumour Growth in the Chick Embryo, *Br. J. Cancer* 35, pp 347-356.
- Matter, A., 2001, Tumour Angiogenesis as a Therapeutik Target, *DDT* Vol 6 No 19, pp 1005-1024.
- Markham, K.R.,1982, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, Penerbit ITB Bandung, hal 24-25.
- McLaughlin, J.L., L.L. Rogers and J.E. Anderson, 1998, The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals, *Drug Information Journal* Vol 32 pp 513-524.
- Meyer, B.N., N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols and J.L. McLaughlin, 1982, Brine Shrimp ; A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituens, *Journal of Medicinal Plant Research, Planta Medica*, Vol 45, pp 31-34.
- Pasha, I.B, 1994, Antitumour Activity of Chloroform-Methanol Fraction of *Scurrula artopurpurea* (BL) Danser, *Majalah Farmasi Airlangga*, Vol. 3 No 1-2, hal 8-11.
- Patten, B.M, 1929, *The Early Embryology of The Chick*, 3th edition, The Blakiston Company Philadelphia, pp 114-127.
- Ribbati, D., A. Gualandris, M. Bastaki, A. Vacca, M. Iurlaro, L. Roncali, M. Presta, 1997, New Model for Study of Angiogenesis and Antiangiogenesis in Chick Embryo Chorioallantoic Membrane: The Gelatin Spong/ Chorioallantoic Membrane Assay, *Journal of Vascular Research*, 34, pp 455-463.

- Saputra, K., 2003, *Manfaat Pengobatan Alternatif Untuk Terapi Kanker*, makalah disampaikan pada Simposium “Obat Herbal dan Akupuntur Estetika pada Era 2003”, Perhimpunan Kedokteran Komplementer dan Akupuntur Indonesia (PKKAI), Jakarta.
- Sastrosupadi, A, 1997, *Statistik Percobaan*, Jilid I, Lembaga Penelitian Tanaman Indonesia, Cabang Wilayah II Malang.
- Singletary, K., C. Mc. Donald, M. Iovinelli, C. Fisher and M. Wallig, 1998, Effect of the β -diketones diferuloylmethane (curcumin) and dibenzoylmethane on rat mammary DNA adduct and Tumors induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, *Carcinogenesis*, Vol 19 No. 9, pp 1039-1043.
- Stenis, C.G.G.J, 1988, *Flora*, alih bahasa M. Suryowinoto, PT Pradnya Paramita, Jakarta, 181-182.
- Storer, T.I. and R.L. Usinger, 1957, *General Zoology*, Mc Graw Hill Book Company, Inc. New York, pp 152-153.
- Sukardiman, H. Poerwono, S. Mubarika, Sismindari, 2002, Skrining Aktivitas Antikanker Fraksi N-Heksana, Etil asetat, N-Butanol dari Ekstrak Metanol Benalu The (*Scurrula artopurpurea*) dengan Molekul Target Enzym DNA Topoisomerase, *Majalah Farmasi Airlangga*, Vol II, hal 72-75.
- Susilowati, S., 2004, *Efek Kemopreventif Ekstrak Etanolik Daun Gynura procumbens (Lour) Merr Terhadap Kanker Payudara Tikus Yang Diinduksi 7.12-Dimetilbenz(a)antrasen (DMBA)*, Tesis Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Sutanti B.R.N. dan Nurtjahyo, 1982, *Jenis-Jenis Benalu yang Tumbuh Pada Pohon Teh*, Laporan Penelitian, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, hal. 1-3.
- Tan W, L. Ping, M. Li, Y. Zhang, Y. Tong, D. Xiao, and J. Ding, 2003, Quercetin, a dietary-derived Flavonoid, Posseses Antiangiogenic Potential, *European Journal of Pharmacology* 459, pp 255-262.
- Underwood, J.C.E., 2000, *General and Systematic Pathology*, 3th edition, Churchill Livingstone, London, pp 470- 490.
- Vacca, A, M. Iurlaro, D. Ribatti, M. Minischetti, B. Nico, R. Ria, A. Pellegrino and F. Dammacco, 1999, Antiangiogenesis is Produced by Nontoxic Doses of Vinblastine, *Hemostasis, Thrombosis and Vascular Biology Blood*, Vol 94 No. 12, pp 4143-4155.

Wagner, H., S. Bladt, E.M. Zgainski, 1984, *Plant Drug Analysis, a Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer-Verlag, Berlin, pp 5-8, 125-127, 163-165.

Woo. Y.T., D.Y. Lai, J.C. Arcos and M.F. Argus, 1985, *Chemical Induction of Cancer Structural Bases and Biological Mechanisms*, Academic Press, Inc. Orlando, p 559.

Lampiran 1

Lampiran 2

Lampiran 3

Gambar Daun Benalu Teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser)

Lampiran 4

Tabel Komposisi air laut buatan dengan kadar garam 5 permil

KOMPOSISI	JUMLAH
NaCl	5 gram
MgSO ₄	1,3 gram
MgCl ₂	1 gram
CaCl ₂	0,3 gram
KCl	0,2 gram
NaHCO ₃	2 gram
Aquades	1 L

Lampiran 5

Komposisi *Buffer Phosphat Saline* (BPS) dan PBS Antibiotika

A. Buffer Phosphat

KOMPOSISI	JUMLAH
NaH ₂ PO ₄	3,5 gram
Na ₂ HPO ₄	13,7 gram
Aguades	1 L

B. Buffer Phosphat Saline (BPS)

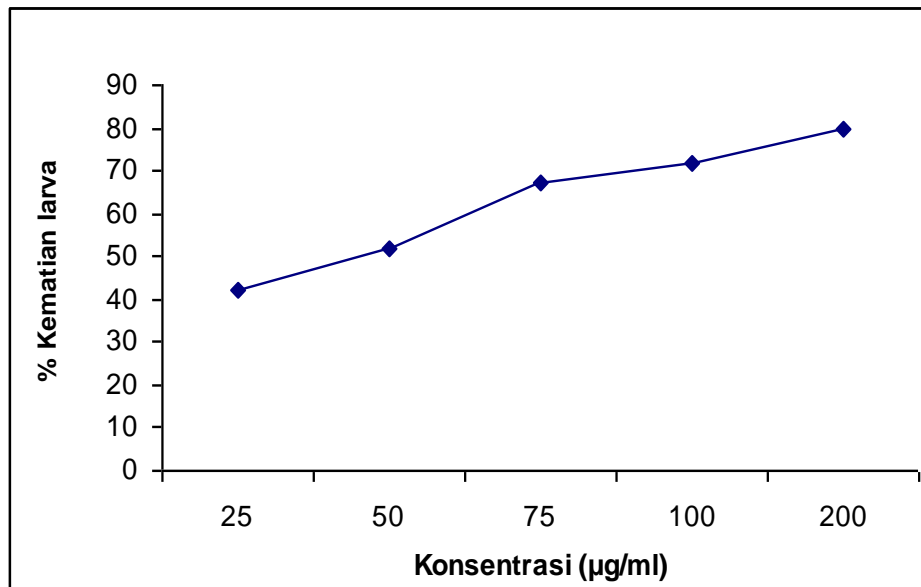
KOMPOSISI	JUMLAH
NaCl	8,5 gram
Aguades	1 L
Buffer Phosphat	40 ml

C. Buffer Phosphat Saline Antibiotik

KOMPOSISI	JUMLAH
BPS	100 ml
Ampicilin	200 mg
Streptomycin	100 mg

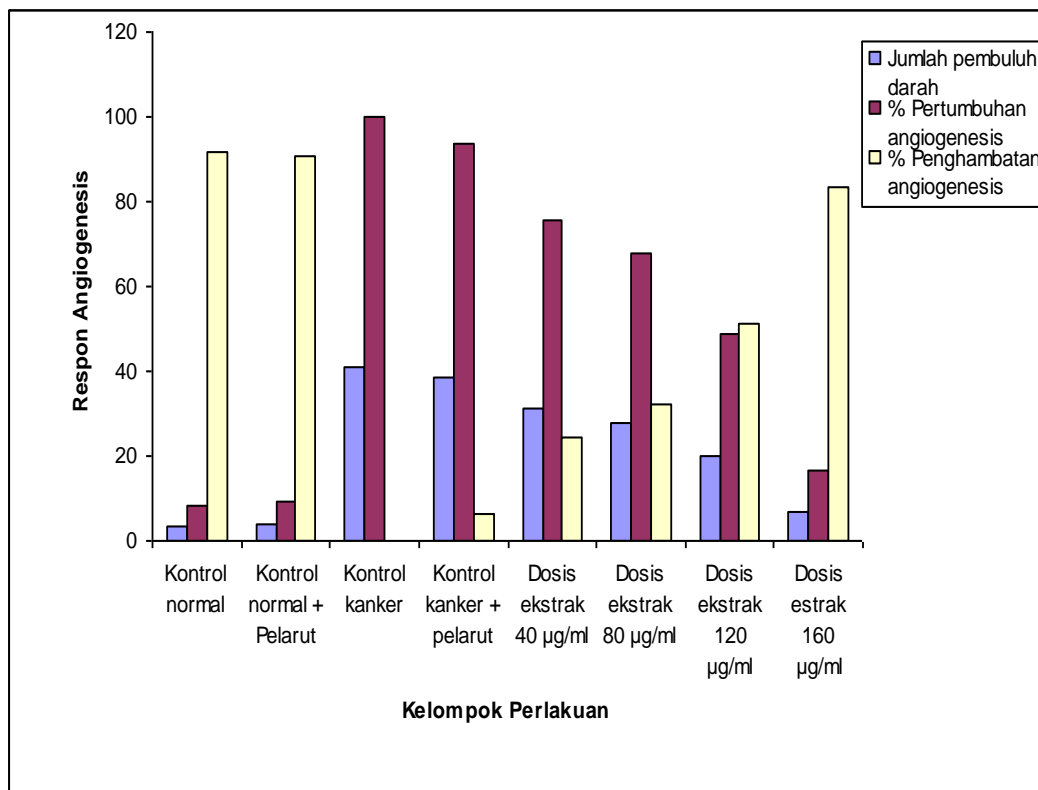
Lampiran 6

Grafik Regresi linear Analisa Probit



Lampiran 7

Grafik Batang Respon Angiogenesis Pada MKA 72 jam Setelah Implantasi Jaringan Payudara Normal, Tumor Payudara dan Pemberian Ekstrak Daun Benalu Teh (*Scurrula atropurpurea* [Blume] Danser)



Lampiran 8

Uji Statistik Non Parametrik Kruskal Wallis dan Mann Whitney Respon penghambatan Angiogenesis Pada MKA 72 jam setelah implantasi

