

SKRIPSI

AKTIVITAS ANTIANGIOGENESIS DARI STRAIN *ACTINOMYCETES* KDR 06-8 DENGAN METODE CAM (*CHORIO ALLANTHOIC MEMBRANE*)

ANTIANGIOGENIC ACTIVITY FROM STRAIN *ACTINOMYCETES* KDR 06-8 WITH CAM (*CHORIO ALLANTHOIC MEMBRANE*) METHOD

Disusun dan diajukan oleh

ANDI NUR AULIA EL FIRMAN

N011 17 1331



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**AKTIVITAS ANTIANGIOGENESIS DARI STRAIN *ACTINOMYCETES* KDR
06-8 DENGAN METODE CAM (*CHORIO ALLANTHOIC MEMBRANE*)**

**ANTIANGIOGENIC ACTIVITY FROM STRAIN *ACTINOMYCETES* KDR 06-8
WITH CAM (*CHORIO ALLANTHOIC MEMBRANE*) METHOD**

SKRIPSI

untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana

**ANDI NUR AULIA EL FIRMAN
N011 17 1331**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**AKTIVITAS ANTIANGIOGENESIS DARI STRAIN *ACTINOMYCETES* KDR
06-8 DENGAN METODE CAM (*CHORIO ALLANTHOIC MEMBRANE*)**

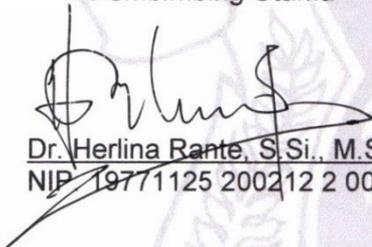
ANDI NUR AULIA EL FIRMAN

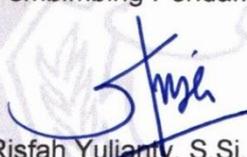
N011 17 1331

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping


Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19771125 200212 2 003


Dr. Risfah Yulianty, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 197807162003122001

Pada tanggal 9 Juni 2021

LEMBAR PENGESAHAN

**AKTIVITAS ANTIANGIOGENESIS DARI STRAIN *ACTINOMYCETES* KDR
06-8 DENGAN METODE CAM (*CHORIO ALLANTHOIC MEMBRANE*)**

**ANTIANGIOGENIC ACTIVITY FROM STRAIN *ACTINOMYCETES* KDR
06-8 WITH CAM (*CHORIO ALLANTHOIC MEMBRANE*) METHOD**

Disusun dan diajukan oleh:

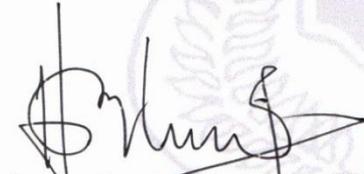
**ANDI NUR AULIA EL FIRMAN
N011 17 1331**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Sarjana Fakultas Farmasi Universitas
Hasanuddin
pada Tanggal 7 Juni 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping



Dr. Hertina Rante, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19771125 200212 2 003



Dr. Risfah Yulianty, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 197807162003122001



Plt. Ketua Program Studi S1 Farmasi,
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin

Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19820610 200801 1 012

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Andi Nur Aulia El Firman

NIM : N011 17 1331

Program Studi : Farmasi

Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul Aktivitas Antiangiogenesis dari strain *Actinomyces* KDR 06-8 dengan metode CAM (*Chorio Allantoic Membrane*) adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila di kemudian hari Skripsi karya saya ini terbukti bahwa sebagian atau keseluruhannya adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 9 Juni 2021

Yang Menyatakan



Andi Nur Aulia El Firman

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, puji syukur kehadiran Allah *subhanahu wata'ala* atas berkat, rahmat dan hidayah-Nya yang senantiasa diberikan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan tugas akhir skripsi yang merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Shalawat serta salam tak lupa selalu tucurahkan kepada Rasulullah *shallallahu 'alaihi wasallam* yang menjadi suri tauladan bagi seluruh umat.

Penulis menyadari selama menyelesaikan penelitian ini banyak hambatan yang dihadapi. Berkat adanya bantuan dan dorongan dari berbagai pihak atas izin Allah *subhanahu wata'ala*, sehingga penulis mampu menyelesaikan penelitian dan menyusun skripsi ini. Oleh sebab itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt selaku pembimbing utama yang senantiasa meluangkan waktu dalam memberikan masukan, arahan dan bimbingan dalam menyelesaikan penelitian dan skripsi penulis dan Ibu Dr. Risfah Yulianty, S.Si., M.Si., Apt. selaku pembimbing pendamping dan penasehat akademik yang telah meluangkan waktu dalam memberikan bimbingan dan arahan sejak penulis berstatus mahasiswa baru hingga menyelesaikan penelitian dan skripsi.

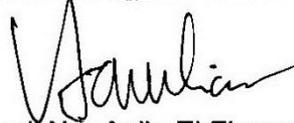
2. Bapak Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed., Ph.D., Apt. dan Aminullah, S.Si., M.Pharm.Sc., Apt selaku tim penguji yang telah meluangkan waktu untuk memberikan masukan dan saran dalam menyelesaikan skripsi ini.
3. Dekan, Wakil Dekan dan staf dosen serta pegawai Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah memberikan ilmu, bimbingan, bantuan, dan segala fasilitas yang diberikan selama penulis menempuh studi hingga menyelesaikan penelitian ini.
4. Seluruh Laboran Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang senantiasa membantu penulis dalam mengerjakan penelitian
5. Teman-teman seperjuangan penelitian, Nurul Inaya Muhtar dan Anisah yang telah membantu penulis dari awal pengerjaan penelitian hingga selesai dan dalam penulisan skripsi penulis.
6. Sahabat-sahabat penulis Shafa Haura Suharto, Asma Aris, Andi Dalauleng, Sri Mailani, Aisyah Andiani, Rusmainnah, Adelia Dwidayanti, Aprilia Holi Ta'bi, Geoni Maleso Todingan, Elma Pebryna Putri dan Luthfiah Fitriany Pelu untuk setiap dukungan, bantuan dan doa yang diberikan kepada penulis.
7. Korps Asisten Laboratorium farmasetika yang senantiasa memberikan ilmunya dan semangat dalam menyelesaikan penelitian dan skripsi penulis
8. Teman-teman angkatan 2017 Farmasi (CLOSTRIDIUM), yang telah bersama-sama penulis dari awal berjuang bersama, memberikan banyak dukungan, semangat, dan pengalaman berharga selama kuliah.

9. Berbagai pihak yang telah membantu penulis yang tidak sempat disebutkan namanya satu per satu

Ucapan terima kasih yang sebesar-besar dan setulus-tulusnya kepada orang tua penulis yaitu ayahanda Drs. H. Andi Firman, M.M dan ibunda Hj. Andi Nuraeni, S.Pd.i., M.M yang telah membesarkan, mendidik dan memberikan dukungan moral maupun material serta doa yang tulus dalam setiap langkah penulis. Saudara penulis dr. Andi Firjatullah El Firman dan Andi Mappaita El Firman yang selalu memberikan dukungan, semangat dan hiburan kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari berbagai pihak. Semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan, Aamiin.

Makassar, 9 Juni 2021



Andi Nur Aulia El Firman

ABSTRAK

ANDI NUR AULIA EL FIRMAN. Aktivitas Antiangiogenesis dari Strain *Actinomyces* KDR 06-8 dengan Metode CAM (*Chorio Allantoic Membrane*) (Herlina Ranted dan Risfah Yulianty).

Angiogenesis merupakan proses pembentukan pembuluh darah baru untuk memasok oksigen dan nutrisi pada jaringan tertentu yang dimediasi oleh sel endotel. Perkembangan sel tumor bergantung pada proses angiogenesis yang dipicu oleh sinyal kimia sel tumor, sehingga inhibitor angiogenesis merupakan strategi pengobatan tumor padat yang dapat menyebabkan sel tumor mengalami hipoksia dan nekrosis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antiangiogenesis dari ekstrak *Actinomyces* KDR 06-8 dengan metode CAM (*Chorio Allantoic Membrane*). Dosis ekstrak *Actinomyces* KDR 06-8 yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 1; 0,5; 0,25 dan 0,125 μg , masing masing diaplikasikan pada kertas cakram yang telah ditambahkan bFGF 10 ng sebagai penginduksi angiogenesis. Selanjutnya kertas cakram yang telah termuati ekstrak dan bFGF diimplantasikan ke dalam telur berembrio berusia 9 hari, dan diinkubasi selama 3 hari. Aktivitas antiangiogenesis dilihat melalui pengamatan makroskopik dengan menghitung pembentukan pembuluh darah baru disekitar kertas cakram. Data yang diperoleh dihitung presentasi penghambatannya dan dianalisis statistik dengan *one way anova* dan uji *post hoc Tukey*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak *Actinomyces* KDR 06-8 dengan dosis 1; 0,5; 0,25 dan 0,125 μg mampu menghambat angiogenesis, dengan rata-rata presentasi penghambatan masing-masing yaitu 56,03; 52; 44,03 dan 26,03 %. Analisis statistik menunjukkan bahwa semua kelompok perlakuan ekstrak berbeda signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok kontrol penginduksi bFGF. Penelitian ini dapat disimpulkan bahwa *Actinomyces* KDR 06-8 dapat digunakan sebagai antiangiogenesis.

Kata Kunci : Angiogenesis, CAM, bFGF, *Actinomyces* KDR 06-8

ABSTRACT

ANDI NUR AULIA EL FIRMAN. Antiangiogenic Activity from Strain *Actinomyces* KDR 06-8 with CAM (Chorio Allanthoic Membrane) Method (Herlina Ranted dan Risfah Yulianty).

Angiogenesis is the process of forming new blood vessels to supply oxygen and nutrients to certain tissues which are mediated by endothelial cells. The development of tumor cells depends on the angiogenesis process which is triggered by chemical signals from tumor cells. Thus, angiogenesis inhibitors are a strategy for treating solid tumors that can cause tumor cells to experience hypoxia and necrosis. This study aims to determine the antiangiogenesis activity of *Actinomyces* KDR 06-8 extract using the CAM (Chorio Allanthoic Membrane) method. The dosages of *Actinomyces* KDR 06-8 extract used in this study were 1; 0.5; 0.25 and 0.125 µg, respectively applied to disc paper which has been added with bFGF 10 ng as an angiogenesis inducer. Furthermore, the disc paper that had been loaded with the extract and bFGF was implanted into embryonic 9 days old embryonic eggs and incubated for 3 days. Antiangiogenesis activity was seen through macroscopic observation by counting the formation of new blood vessels around the disc paper. The data obtained were calculated the percentage of inhibition and were analyzed statistically by one way anova and Tukey's post hoc test. The results showed that the *Actinomyces* extract KDR 06-8 with a dose of 1; 0.5; 0.25 and 0.125 µg were able to inhibit angiogenesis, with the mean presentation of inhibition respectively 56.03; 52; 44.03 and 26.03 %. Statistical analysis showed that all the extract treatment groups were significantly different ($p < 0.05$) from the bFGF-induction control group. In this study, it can be concluded that *Actinomyces* KDR 06-8 can be used as antiangiogenesis.

Keywords: Angiogenesis, CAM, bFGF, *Actinomyces* KDR 06-8

DAFTAR ISI

	halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1. Latar Belakang	1
I.2. Rumusan Masalah	4
I.3. Tujuan Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
II.1. <i>Actinomyces</i>	6
II.1.1. Klasifikasi dan Karakteristik	6
II.1.2. Habitat	9
II.1.3 Metabolit Sekunder	10
II.2. Kanker	11
II.2.1. Penyebab Kanker	11
II.3. Angiogenesis	13
II.3.1. Proses Angiogenesis	14

	halaman
II.3.2. Faktor Pertumbuhan Fibroblas (<i>Fibroblast Growth Factor/FGF</i>)	17
II.4. <i>Chorio Allantoic Membrane</i> (CAM)	18
BAB III METODE PENELITIAN	20
III.1. Alat dan Bahan	20
III.2. Metode Kerja	20
III.2.1. Penyiapan sampel	20
III.2.2. Pembuatan medium	21
III.2.2.1. Pembuatan medium <i>Starch Nitrat Agar</i> (SNA)	21
III.2.2.1. Pembuatan medium <i>Starch Nitrat Broth</i> (SNB)	21
III.2.3. Fermentasi isolat bakteri	21
III.2.4. Ekstraksi hasil fermentasi	22
III.2.5. Uji antiangiogenesis	22
III.2.5.1. Sterilisasi alat	22
III.2.5.2. Preparasi sediaan uji	22
III.2.5.3. Uji aktivitas antiangiogenesis	23
III.2.6. Analisis Data	25
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	27
IV.1. Peremajaan Isolasi <i>Actinomyces</i> KDR 06-8	27
IV.2. Fermentasi dan Ekstraksi	28
IV.3. Uji Antingiogenesis	29
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	35
V.1. Kesimpulan	35

	halaman
V.2. Saran	35
DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN	40

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Hasil pengamatan respon antiangiogenesis	32

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Pertumbuhan isolat <i>Actinomyces</i> pada <i>starch casein agar</i>	7
2. Berbagai jenis rantai spora yang diproduksi oleh <i>Actinomyces</i>	8
3. Isolat <i>Actinomyces</i> KDR 06-8 yang telah diinkubasi selama 7 hari	25
4. Perbandingan respon angiogenesis kelompok kontrol	28
5. Isolat <i>Actinomyces</i> KDR 06-8	40
6. Hasil Fermentasi	40
7. Proses Ekstraksi	40
8. Hasil Ekstraksi	40
9. Kontrol kertas cakram	41
10. Kontrol bFGF	41
11. Kontrol DMSO 0,8%	41
12. Kontrol DMSO 0,8% + bFGF	41
13. 1 µg ekstrak uji + bFGF	42
14. 0,5 µg ekstrak uji + bFGF	42
15. 0,25 µg ekstrak uji + bFGF	42
16. 0,125 µg ekstrak uji + bFGF	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema Kerja Penelitian	38
2. Dokumentasi Penelitian	40
3. Data Hasil Analisis Statistika	43

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama diseluruh dunia. Data *Global Burden of Cancer* (Globocan) menyebutkan bahwa pada tahun 2018 terdapat 18,1 juta kasus baru dengan angka kematian sebesar 9,6 juta kematian. Sementara di Indonesia angka kejadian penyakit kanker (136,2/100.000 penduduk) berada pada urutan ke-8 di Asia Tenggara, sedangkan di Asia berada pada urutan ke-23. Berdasarkan data Riskesdas, prevelensi tumor/kanker di Indonesia menunjukkan adanya peningkatan dari 1,4 per 1000 penduduk pada tahun 2013 menjadi 1,79 per 1000 penduduk pada tahun 2018 (Kemenkes RI, 2019; Ok *et al.*, 2018).

Pengembangan dan pilihan pengobatan kanker semakin dieksplorasi terus menerus karena melihat tingkat kejadian kanker yang terus meningkat. Keberhasilan pengobatan kanker tergantung pada jenis kanker, lokasi tumor, dan tahap perkembangannya. Beberapa pengobatan kanker yaitu bedah, pisau bedah yang berbasis radiasi, kemoterapi, radioterapi dan pengobatan modern seperti terapi hormon, antiangiogenesis, terapi sel induk dan imunoterapi. Strategi terkini terkait pengobatan kanker, selain hanya membunuh sel tumor juga dilakukan pendekatan terapi antiangiogenesis (Abbas and Rehman, 2018; Al-Abd *et al.*, 2017).

Terapi antiangiogenesis memiliki keunggulan dibandingkan dengan pengobatan konvensional seperti kemoterapi yaitu antiangiogenesis hanya bekerja pada pembuluh darah tumor sehingga memicu kematian sel dari semua sel tumor yang disuplai oleh pembuluh darah tumor. Sedangkan pengobatan kemoterapi memiliki banyak efek samping karena selain menargetkan sel tumor juga menargetkan sel normal disekitar sel tumor. Selain itu terapi antiangiogenesis juga dapat digunakan untuk pengobatan berbagai jenis tumor padat diantaranya sarkoma, karsinoma dan limfoma (Abbas and Rehman, 2018; Pons-Cursach and Casanovas, 2017).

Angiogenesis adalah proses pembentukan pembuluh darah yang baru dari pembuluh darah yang sudah ada sebelumnya untuk memasok oksigen dan nutrisi ke sel-sel yang jauh dari pembuluh darah yang ada. Angiogenesis merupakan proses yang kompleks dan dimediasi oleh sel endotel yang melapisi pembuluh darah. Angiogenesis merupakan proses yang normal seperti saat penyembuhan luka, perbaikan dan regenerasi tulang serta selama siklus menstruasi. Selain itu mengatur viabilitas, proliferasi dan diferensiasi struktur jaringan yang baru berkembang. Penghambatan angiogenesis merupakan strategi penting dalam pengobatan tumor karena terjadinya pemotongan suplai darah ke daerah mikro tumor sehingga mengakibatkan kekurangan oksigen dan kematian sel (Al-Abd *et al.*, 2017; Raja *et al.*, 2019; Teleanu *et al.*, 2019).

Inhibitor angiogenesis bekerja pada beberapa protein yang berperan sebagai aktivator angiogenik. Salah satu aktivator angiogenik yang kuat

adalah *basic fibroblast growth factor* (bFGF) karena dapat meningkatkan mitogenesis sel endotel. *Basic fibroblast growth factor* (bFGF) merupakan anggota dari keluarga FGFs (*fibroblast growth factor*) yang mengontrol proliferasi, migrasi dan diferensiasi berbagai jenis sel, selain itu bFGF juga memiliki potensi penyembuhan luka serta regenerasi tulang, adiposa dan gigi (Rajabi and Mousa, 2017; Yun *et al.*, 2010).

Upaya pengembangan pengobatan kanker dilakukan secara intensif dan produk alam merupakan sumber yang menjanjikan dalam penemuan obat antikanker baru. Salah satunya adalah bakteri *Actinomycetes* yang diisolasi dari laut. Gao *et al.*, (2012) mengisolasi *actinomycetes* laut yang teridentifikasi sebagai *Nocardia dassonvillei* dan memperoleh metabolit sekunder yaitu senyawa 2-phenazinamine (NHP) yang memiliki sitotoksitas sel kanker yang tinggi terhadap hati manusia, sel epitel adenokarsinoma paru dan usus besar manusia serta sel kanker ovarium manusia. Pada penelitian Davies-Bolorunduro *et al.*, (2019) juga mengisolasi *Actinomycetes* laut dan menghasilkan metabolit yang memiliki efek sitotoksi dibawah konsentrasi 1 mg/mL.

Beberapa senyawa anti kanker yang diproduksi dari *Actinomycetes* laut diantaranya yaitu senyawa poliketida memiliki aktivitas menghambat proliferasi sel kanker, peptida nonribosomal merupakan senyawa yang memiliki aktivitas antikanker dengan melawan adenokarsinoma paru dan sel leukimia, campuran poliketida dan peptida nonribosomal ditemukan memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan murine sel melanoma. Aktivitas

antikanker dari *Actinomycetes* laut paling banyak berasal dari genus *Streptomyces* dan dari golongan senyawa poliketida (Naine *et al.*, 2011; Olano *et al.*, 2009). Rahman (2020), telah mengisolasi *Actinomycetes* KDR 06-8 yang diperoleh dari simbiosis spons di perairan Pulau Kodingareng yang memiliki aktivitas sebagai antimikroba dan diduga sebagai *Streptomyces*.

Pengujian antiangiogenesis ini dilakukan secara *in vivo* dengan menggunakan metode CAM (*Chorio Allantoic Membrane*). Metode ini merupakan metode standar yang digunakan untuk mengevaluasi potensi angiogenik suatu biomaterial. Metode ini digunakan karena vaskularisasi yang luas dan mudah, harga yang relatif murah dan dapat melakukan skrining dengan skala lebih besar karena dapat menggunakan berbagai kelompok uji sehingga dapat melihat efektivitas pengujian inhibitor. Jika dibandingkan dengan pengujian antiangiogenesis yang lain seperti metode yang menggunakan sel endotel secara *in vitro* yang memiliki beberapa keterbatasan yaitu tidak semua sel endotel sama karena adanya perbedaan fenotip, sehingga perlu menggunakan beberapa bagian sel endotel dan adanya perbedaan perilaku sel ketika berada di luar dan di dalam fungsi fisiologis sehingga tidak mewakili interaksi fisiologis. Selain itu metode uji angiogenesis kornea, lebih mahal dan membutuhkan teknis yang lebih sulit dibandingkan dengan metode *chorio allantoic membrane* (CAM) (Raja *et al.*, 2019; Ribatti, 2010; Staton *et al.*, 2004).

Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui adanya aktivitas antiangiogenesis dari strain *Actinomycetes* KDR

06-8 secara *in vivo* dengan menggunakan metode CAM (*Chorio Allantoic Membrane*).

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka rumusan masalah yang timbul pada penelitian ini adalah apakah bakteri *Actynomicetes* KDR 06-8 memiliki aktivitas antiangiogenesis?

I.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui aktivitas antiangiogenesis dari strain bakteri *Actynomicetes* KDR 06-8 yang diuji secara *in vivo* menggunakan metode CAM (*Chorio Allantoic Membrane*).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

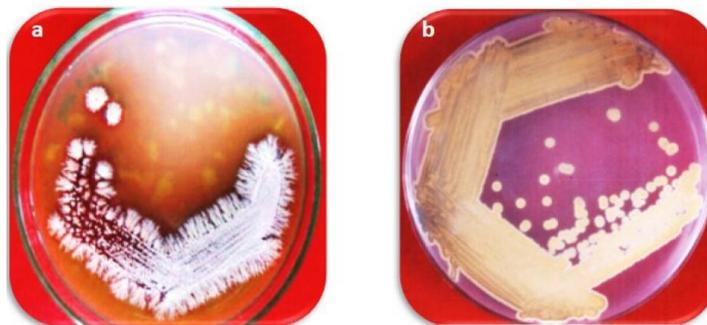
II.1 *Actinomycetes*

II.1.1 Klasifikasi dan Karakteristik

Actinomycetes merupakan salah satu unit taksonomi terbesar dengan 18 garis keturunan dan masuk kedalam domain bakteri, terdiri atas 4 subclass, 6 ordo dan 14 subordo. Taksonomi *Actinomycetes* telah berkembang secara signifikan dari waktu ke waktu, *Actinomycetes* termasuk dalam kelompok organisme prokariotik dan termasuk dalam filum *Actinobacteria* (Barka *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2019).

Actinomycetes yang biasa juga dikenal dengan istilah *Actinobacteria* merupakan kelompok bakteri gram positif dengan kandungan guanin dan sitosin (GC) yang tinggi dalam DNA mereka, yang bisa berupa terestrial atau akuatik (Ananda and Dharumadurai D., 2016) . *Actinomycetes* dianggap sebagai bentuk transisi antara bakteri dan fungi karena secara morfologi mirip dengan fungi dan secara fisiologi menyerupai bakteri. *Actinomycetes* dicirikan menghasilkan miselium dan berkembang biak dengan sporulasi seperti fungi, bersifat uniseluler seperti bakteri dan memiliki dinding sel yang sama dengan bakteri (Ananda and Dharumadurai D., 2016; Barka *et al.*, 2016). *Actinomycetes* bersifat heterotrof dan aerobik tetapi terdapat beberapa yang bersifat anaerobik seperti *Actinomyces* (Dilip *et al.*, 2013).

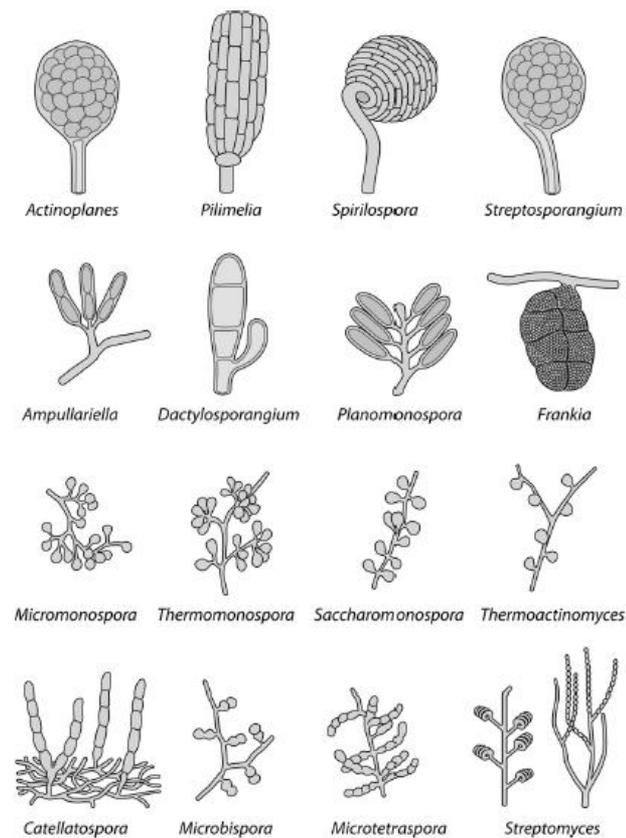
Pertumbuhan *Actinomycetes* ditandai dengan kecil kompak, koloni lunak sampai keras, konsistensi seperti tepung dan menempel kuat pada permukaan agar, permukaannya datar atau tinggi, menghasilkan hifa dan konidia/sporangia mirip jamur pada media kultur (Ananda and Dharumadurai D., 2016; Tiwari *et al.*, 2019). Miselium yang dihasilkan dapat tumbuh di permukaan dan di bawah agar, miselium dipermukaan disebut miselium udara atau aerial dan miselium di bawah disebut miselium substrat (Sharma *et al.*, 2019). Miselium aeril biasa lebih tebal dan menunjukkan diferensiasi yang baik sehingga isolat dapat dipisahkan menjadi beberapa kelompok berdasarkan morfologi yang sama. Warna miselium aeril mulai dari putih, putih krem, berkapur, coklat, abu-abu hingga merah muda dan ungu. Sedangkan miselium substrat bervariasi ukuran bentuk dan ketebalannya. Warnanya dari putih atau hampir tidak berwarna, kuning, coklat, merah, merah muda, jingga, hijau atau hitam (Ananda and Dharumadurai D., 2016; Tiwari *et al.*, 2019).



Gambar 1: Pertumbuhan isolat *Actinomycetes* pada *starch casein agar*: a. Miselium udara dan b. Miselium substrat (Ananda and Dharumadurai D., 2016)

Jenis dan jumlah spora dari *Actinomycetes* sangat bervariasi dari genus ke genus, seperti pada genera *Micromonospora*, *Salinispora*,

Thermomonospora, *Saccharomonospora*, dan *Promicromonospora* menghasilkan spora terisolasi, sedangkan *Microbispora* menghasilkan spora berpasangan longitudinal. Anggota genera *Actinomadura*, *Saccharopolyspora*, *Sporichthya*, dan beberapa *Nocardia* spp. memiliki rantai spora pendek, sedangkan anggota genera *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Kitasatospora*, *Streptoverticillium*, dan beberapa *Nocardia* spp. menghasilkan rantai yang sangat panjang hingga 100 spora. Rantai spora *Streptomycetes* dapat diklasifikasikan beberapa jenis yaitu lurus sampai lentur (*Rectus-Flexibilis*), loop terbuka (*Relinaculam Apertum*), spiral terbuka atau tertutup (*spira*), atau *verticillate* (Barka et al., 2016).



Gambar 2. Berbagai jenis rantai spora yang diproduksi oleh Actinomycetes (Barka et al., 2016)

Suhu inkubasi optimum untuk *Actinobacteria* mesofilik, termotoleran dan termofilik sedang yaitu 28°C, 37°C dan 45°C. *Actinobacteria* mesofilik dapat tumbuh pada suhu optimal antara 20°C-42°C dan spesies termotoleran dapat bertahan hidup pada suhu 50°C (Ananda and Dharumadurai D., 2016).

II.1.2 Habitat

Actinomycetes merupakan saprofit yang banyak tersebar dan hidup di beberapa habitat di alam terutama di tanah dan *Streptomyces* sebagai populasi utamanya. Faktor lingkungan akan mempengaruhi jenis dan populasi *Actinomycetes* dalam tanah. *Actinomycetes* ditemukan pada lingkungan mesofilik (25-30°C) dan termofilik (40°C) dan kebanyakan *Actinomycetes* tumbuh optimum pada pH sekitar 7. Beberapa laporan menunjukkan distribusi *Actinomycetes* di berbagai lokasi seperti tanah berpasir, tanah alkali hitam, tanah lempung berpasir, tanah alkali dan tanah subtropis (Ananda and Dharumadurai D., 2016; Tiwari *et al.*, 2019).

Actinomycetes juga terdistribusi secara luas di perairan seperti laut dan air tawar. *Mikromonospora* merupakan genus dominan yang terdapat di air tawar yang memiliki peran dalam pergantian selulosa, kitin dan lignin. Sumber *Actinomycetes* laut terbaik adalah sedimen, pasir, bebatuan, makanan laut, tumbuhan laut dan sedimen mangrove. *Actinomycetes* laut telah ditemukan bersimbion dengan berbagai invertebrata laut terutama spons. Sebagian besar senyawa yang diproduksi oleh *Actinomicetes* laut memiliki aktivitas sebagai antibakteri, antijamur, antiparasit, antikanker, dan antimalaria (Aly *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2019).

II.1.3 Metabolit Sekunder

Telah dilaporkan sekitar 23.000 metabolit sekunder bioaktif yang dihasilkan oleh mikroorganisme dan lebih dari 10.000 senyawa ini diproduksi oleh *Actinomycetes*, mewakili sekitar 45% dari semua bioaktif metabolit mikroba yang ditemukan. Diantara *Actinomycetes*, sekitar 7.600 senyawa diproduksi oleh spesies *Streptomyces*. *Actinomycetes* laut telah menarik perhatian karena memiliki kemampuan metabolisme yang unik yang tidak hanya memastikan kelangsungan hidup dalam kondisi ekstrim tetapi juga memiliki potensi untuk menghasilkan senyawa antitumor dan aktivitas farmakologis menarik lainnya. Salah satu kelompok senyawa yang paling banyak dihasilkan oleh *Actinomycetes* dan memiliki potensi sebagai anti kanker adalah kelompok poliketida (Olano et al., 2009).

Poliketida merupakan keluarga besar produk alami yang diproduksi oleh kondensasi bertahap dekarboksilatif Claisen-type dari prekursor asil-CoA, reaksi ini dikatalisis oleh poliketida sintase (PKS). Kerangka karbon poliketida dapat dikurangi dan dimodifikasi lebih lanjut berdasarkan pemrograman yang dikodekan oleh domain berbeda yang ada di PKS dengan aktivitas ketoreduktase, dehidratase dan enoilreduktase. Terdapat tiga jenis poliketida sintase, tipe I yaitu enzim multifungsi yang terorganisir ke dalam modul, tipe II yaitu kompleks multienzim yang melakukan satu set aktivitas dan tipe III yang juga dikenal sebagai chalcone sintase yaitu enzim kondensasi yang bekerja secara iteratif (Olano et al., 2009). Kelompok poliketida dicirikan dengan adanya gugus ketida ($\text{CH}_2\text{-CO-}$) yang berulang (Bentley and Bennet, 1999).

II.2 Kanker

Kanker merupakan kumpulan dari beberapa penyakit yang terjadi karena adanya kelainan pada regulasi pembelahan sel dan metastasis yang mengacuh pada kemampuan dari sel kanker untuk melepaskan diri melintasi jaringan, masuk melalui pembuluh darah dan tumbuh di lingkungan baru, sehingga mempunyai potensi untuk menginvasi dan menyebar ke organ sekitar atau organ jauh (Ok *et al.*, 2018). Ciri khas dari sel kanker yaitu tumbuh secara independen dari faktor atau sinyal apapun, berbeda dengan sel normal yang memiliki sinyal pertumbuhan terbatas dan akan berhenti berkembang biak. Sel kanker tidak responsif terhadap sinyal yang menghentikan pembelahan sel, sedangkan sel normal akan menghentikan pembelahan selnya jika berada pada ambang batas tertentu. Replikasi yang tidak terkendali dari sel kanker dan menghindari apoptosis, sedangkan kehidupan sel normal hanya akan membagi dirinya sekitar 50 kali dan kemudian mati karena apoptosis dan digantikan oleh sel baru. Sel kanker mengalami angiogenesis berkelanjutan dan kemampuan untuk menembus jaringan lain atau metastasis (Abbas and Rehman, 2018).

II.2.1 Penyebab Kanker

Penyebab utama kanker yaitu adanya kerusakan atau perubahan DNA dan ketidakstabilan genom. Adapun beberapa penyebab lain dari kanker yaitu (Bansode, 2019).

1. Karsinogen

Karsinogen merupakan zat tertentu yang berperan pada penyebab terjadinya kanker. Contoh umum karsinogen non radioaktif adalah asbes yang dihirup, dioksin tertentu dan asap tembakau. Setiap tahun sekitar 200.000 orang meninggal di seluruh dunia akibat kanker yang berhubungan dengan tempat kerja mereka. Jutaan pekerja beresiko terkena kanker seperti kanker paru-paru dan mesothelioma karena menghirup serat asbes dan asap tembakau, atau leukimia akibat paparan benzen di tempat kerja mereka.

2. Gaya hidup

Banyak faktor gaya hidup yang berkontribusi pada peningkatan resiko terjadinya kanker. Seperti merokok, mengkonsumsi alkohol dan obesitas. Merokok tembakau dapat menyebabkan beberapa jenis kanker diantaranya seperti kanker paru-paru, laring, kandung kemih, ginjal, kerongkongan dan pankreas. Asap tembakau mengandung lebih dari 50 karsinogen yang diketahui termasuk nitrosamin dan hidrokarbon polisiklik aromatik. Alkohol merupakan karsinogen kimiawi yang dapat menyebabkan sirosis hati dan perkembangan karsinoma hepatoseluler. Perkembangan kanker yang dikaitkan dengan obesitas berkaitan dengan tingkat abnormal protein metabolik dan hormon seks (estrogen, androgen dan progesteron).

3. Virus

Infeksi virus merupakan faktor resiko utama kanker serviks dan hati. Virus yang dapat menyebabkan kanker diantaranya yaitu *human papillomavirus*

(karsinoma serviks), virus *Epstein-Barr*, virus herpes sarkoma Kaposi, hepatitis B, hepatitis C dan Human T-leukimia sel virus-1.

4. Bakteri dan parasit

Infeksi bakteri tertentu juga dapat meningkatkan resiko kanker, seperti karsinoma lambung yang diinduksi oleh *Helicobacter pylory*. Infeksi parasit yang terkait dengan kanker yaitu *Schistosoma haematobium* penyebab karsinoma sel skuamosa kandung kemih, cacing hati, *Opisthorchis viverrini* dan *Clonorchis sinensis*. Peradangan yang dipicu oleh telur cacing tampaknya menjadi mekanisme penyebab kanker. Infeksi parasi juga dapat meningkatkan senyawa karsinogenik di dalam tubuh yang menyebabkan perkembangan kanker.

5. Radiasi

Sekitar 10 kanker invasif terkait dengan paparan radiasi, baik radiasi non pengion dan pengion. Radiasi pengion dapat menyerang molekul di dalam sel secara acak. Jika kebetulan menyerang kromosom, maka dapat menyebabkan translokasi kromosom, sehingga dapat terjadinya kematian sel atau kerusakan sel. Walaupun radiasi tidak menyerang DNA secara langsung tetapi dapat memicu respon dari sel yang secara tidak langsung meningkatkan kemungkinan mutasi.

II.3 Angiogenesis

Istilah “angiogenesis” diperkenalkan pada tahun 1787 oleh ahli bedah Dr. John Hunter untuk menggambarkan pembentukan pembuluh darah baru dalam proses penyembuhan luka. Angiogenesis adalah proses fisiologis yang

penting untuk membentuk pembuluh darah vaskular yang baru dari pembuluh darah yang sudah ada sebelumnya untuk memasok oksigen dan nutrisi pada jaringan tertentu. Angiogenesis berperan dalam proses embriogenesis, penyembuhan luka dan selama siklus menstruasi. Proses angiogenesis yang berkepanjangan biasanya merupakan indikasi kondisi patologis seperti artritis, retinopati diabetik atau perkembangan tumor (Al-Abd *et al.*, 2017).

Perkembangan tumor bergantung pada angiogenesis dan limfangiogenesis yang dipicu oleh sinyal kimiawi dari sel tumor dalam fase pertumbuhan cepat. Sel kanker hanya akan tumbuh dengan diameter 1-2 mm tanpa adanya sirkulasi darah dan kemudian berhenti, tetapi akan tumbuh melebihi 2 mm saat ditempatkan di area angiogenesis. Sehingga, dengan tidak adanya dukungan vaskular, tumor dapat mengalami nekrosis atau bahkan apoptosis. Homeostasis vaskular diatur oleh faktor pro dan anti-angiogenik. Ketika faktor ini seimbang, pembuluh darah akan diam dan sel endotel bersifat non proliferasif (Lugano *et al.*, 2020; Nishida *et al.*, 2006).

II.3.1 Proses Angiogenesis

Angiogenesis dapat diinduksi sebagai respon terhadap cedera melalui faktor pro dan antiangiogenik. Faktor pro angiogenik terdiri dari trombin, fibrinogen, thymosin- β 4 dan faktor pertumbuhan. Faktor pertumbuhan angiogenik disimpan dalam trombosit dan sel-sel inflamasi yang beredar dalam aliran darah dan diasingkan dalam ECM (ekstraselular matriks). Produksi faktor tersebut diatur oleh gen yang diekspresikan sebagai respon terhadap hipoksia dan inflamasi, seperti *hypoxia-inducible factor* (HIF) dan COX 2

(siklooksigenase-2). Sementara faktor penghambat angiogenesis menekan pertumbuhan pembuluh darah beredar dalam aliran darah sementara yang lain disimpan di sekitar ECM (ekstraselular matriks). Pertumbuhan pembuluh darah ditekan ketika keseimbangan fisiologis antara angiogenesis stimulator dan inhibitor (Kumar *et al.*, 2015).

Proses pembentukan pembuluh darah baru tersusun dari beberapa tahapan yaitu (Felmeden *et al.*, 2003):

1. Aktivasi sel endotel dan pericyte

Langkah utama angiogenesis dimulai dengan aktivasi sel endotel pembuluh darah yang sudah ada sebelumnya sebagai respon terhadap peningkatan tingkat rangsangan angiogenik lokal. Hal ini menyebabkan vasodilatasi lokal, peningkatan permeabilitas vaskular dan gangguan membran basal yang meliputi sel endotel dari kapiler yang ada melalui degradasi proteolitik.

2. Degradasi membran basal dan migrasi sel endotel

Stimulus angiogenik menyebabkan degradasi membran basal vaskular proteolitik. Enzim protease dapat diaktivasi oleh molekul pengatur pertumbuhan. Gangguan pada membran basal memungkinkan proses sitoplasma meluas dari sel endotel yang aktif, mengarahkan migrasi dan tumbuh ke dalam ruang ekstravaskular menuju stimulus angiogenik.

3. Proliferasi dan diferensiasi sel endotel

Selama proses migrasi, diikuti dengan proliferasi sel endotel yang distimulasi oleh faktor angiogenik. Mitogen yang diproduksi secara lokal

akan menginduksi sintesis DNA sel endotel dan mitosis. Selanjutnya terjadi pemanjangan dan penyesuaian sel yang diikuti dengan pembentukan kecambah kapiler. Tunas yang tumbuh akhirnya mengembangkan lumen dan akibatnya struktur tubular ini akan mengalami anastomosis dengan pembuluh disekitarnya.

4. Rekonstruksi membran basal

Pematangan pembentukan pembuluh darah dicapai dengan rekonstruksi membran basal yang disintesis oleh sel endotel dan pericytes. Lingkaran kapiler yang dihasilkan akan memediasi terjadinya sirkulasi darah

5. Pematangan dan stabilisasi pembuluh darah

Pada tahapan akhir, pembuluh darah akan direnovasi dengan stabilisasi dan regresi. Perkembangan pembentukan dan renovasi pembuluh darah dimediasi oleh sinyal parakrin dan proses pematangan selesai dengan pembentukan membran basal.

Pada kondisi fisiologis proses angiogenesis terjadi saat jaringan memiliki perfusi yang buruk, ketika mekanisme penginderaan oksigen mendeteksi tingkat hipoksia yang menuntut pembentukan pembuluh darah baru untuk memenuhi kebutuhan metabolisme sel parenkim. Sebagian besar sel parenkim seperti miosit, hepatosit, neuron, astrosit dan lainnya akan merespon lingkungan hipoksi dengan mensekresikan faktor pertumbuhan proangiogenik utama yang disebut *vaskular endothelial growth factor* (VEGF-A) (Adair and Montani., 2010).

II.3.2 Faktor Pertumbuhan Fibroblas (*Fibroblast Growth Factor/FGF*)

Faktor pertumbuhan fibroblas (FGF) merupakan anggota dari keluarga faktor pertumbuhan pengikat heparin. Faktor pertumbuhan fibroblas (FGF) adalah faktor pertumbuhan representatif yang telah menunjukkan efek potensial pada perbaikan dan regenerasi jaringan. Beberapa fungsi dari FGF bekerja melalui pengikatan dan aktivasi reseptor faktor pertumbuhan fibroblas (FGFRs), dan sinyal utama stimulasi FGFR adalah RAS/MAP jalur kinase. Awalnya protein ini diidentifikasi sebagai protein yang mampu mendorong proliferasi fibroblas dan sekarang diketahui protein ini terdiri dari 22 anggota, beberapa diantaranya yaitu asam FGF (*acid Fibroblast Growth Factor/a-FGF* atau FGF-1) dan basa FGF (*basic Fibroblast Growth Factor/b-FGF* atau FGF-2), kedua anggota keluarga ini memiliki aktivitas angiogenik. Akan tetapi, FGF-2 dianggap lebih kuat dari FGF-1 sekitar 30-100 kali lipat (Gupta *et al.*, 2012; Yun *et al.*, 2010).

Adapun beberapa fungsi faktor pertumbuhan fibroblas diantaranya yaitu (Gupta *et al.*, 2012):

1. Pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis): FGF-2 memiliki kemampuan untuk menginduksi semua langkah yang diperlukan untuk pembentukan pembuluh darah baru. FGF-1 merangsang proliferasi sel endotel dan FGF-2 secara aktif mengatur produksi kolagen tipe 1 dan laminin oleh sel PDL. Laminin adalah salah satu zat biologis terpenting yang berpartisipasi dalam angiogenesis.

2. Perbaikan luka: FGF menstimulasi proliferasi dan/atau migrasi sebagian besar sel utama yang terlibat dalam penyembuhan luka termasuk sel endotel kapiler, sel endotel vaskular, fibroblas, keratinosit, sel epitel dan jenis sel khusus seperti kondrosit dan mioblas.
3. Pengembangan: FGF bereperan dalam perkembangan otot rangka dan pematangan paru-paru. Misalnya FGF-6 dan reseptornya menginduksi mioblas dan menekan diferensiasi miosit, menyediakan suplai miosit yang berproliferasi. FGF-2 juga dianggap terlibat dalam pembentukan angioblas selama embriogenesis.
4. Efek pada tulang: FGF merangsang replikasi sel tulang tetapi dalam beberapa kondisi dapat menghambat sintesis matriks oleh sel tulang. Secara *In vivo* FGF telah terbukti meningkatkan pembentukan tulang, dan mempercepat laju perbaikan patah tulang.

II.4. Chorio Allantoic Membrane (CAM)

CAM (*chorio allantoic membrane*) adalah membran ekstraembrionik yang terbentuk pada hari ke-4 inkubasi melalui fusi korion dan allantois (Ribatti, 2010). Membran ini bertanggung jawab untuk transportasi kalsium dari kulit telur ke dalam embrio, berfungsi dalam pertukaran gas, keseimbangan asam basa serta reabsorpsi air dan elektrolit (Gabrielli and Accili, 2010). Metode pengujian CAM (*chorio allantoic membrane*) merupakan uji *in vivo* yang paling banyak digunakan untuk mengetahui aktivitas angiogenesis. Zat uji yang telah disiapkan diaplikasikan pada cakram kemudian ditanamkan ke CAM melalui jendela yang dipotong hati-hati di kulit telur. CAM memiliki sensitifitas yang

tinggi terhadap perubahan tegangan oksigen sehingga penyegelan jendela merupakan prosedur yang sangat penting diperhatikan. Efek angiogenesis dapat diukur dengan menghitung jumlah pembuluh darah di area tertentu (Ribatti, 2010; Staton *et al.*, 2004).

Metode CAM memiliki beberapa keuntungan yaitu biaya yang relatif murah, sederhana dan dapat melakukan skrining dengan skala lebih besar karena dapat menggunakan berbagai kelompok uji sehingga dapat melihat efektivitas pengujian inhibitor (Ribatti, 2010). Dibandingkan dengan metode pengujian yang lain yang membutuhkan teknik yang sulit seperti pengujian menggunakan kornea dan sel endotel (Staton *et al.*, 2004). Selain itu metode CAM memiliki vaskularisasi yang baik, reproduktifitas yang tinggi serta CAM mengandung protein matriks ekstraseluler yang mirip dengan fisiologi sel kanker (Lokman *et al.*, 2012). Akan tetapi, pengujian menggunakan metode ini kemungkinan dapat menghasilkan reaksi inflamasi sehingga sulit membedakan efek dari zat uji, namun kekurangan ini dapat diatasi dengan melakukan percobaan di awal perkembangan CAM karena pada saat itu sistem kekebalan tubuh inang relatif belum matang (Ribatti, 2010). Selain untuk pengujian angiogenesis, metode CAM juga dapat digunakan dalam pengujian transportasi obat untuk pengembangan obat-obatan dan untuk mengidentifikasi alergen kosmetik (Gabrielli and Accili, 2010).