

SKRIPSI

AKTIVITAS ANTIANGIOGENESIS METABOLIT SEKUNDER FUNGI SIMBION SPONS DENGAN METODE CAM (*CHORIO ALLANTHOIC MEMBRANE*)

ANTIANGIOGENESIS ACTIVITY OF SECONDARY METABOLITE FUNGI SYMBIONT SPONS BY CAM (*CHORIO ALLANTHOIC MEMBRANE*) METHOD

Disusun dan diajukan oleh

NURUL INAYA MUHTAR

N011 17 1516



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

**AKTIVITAS ANTIANGIOGENESIS METABOLIT SEKUNDER FUNGI
SIMBION SPONS DENGAN METODE CAM (*CHORIO ALLANTOIC
MEMBRANE*)**

**ANTIANGIOGENESIS ACTIVITY OF SECONDARY METABOLITE
FUNGI SYMBIONT SPONS BY CAM (*CHORIO ALLANTHOIC
MEMBRANE*) METHOD**

SKRIPSI

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

**NURUL INAYA MUHTAR
N011 17 1516**

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

**AKTIVITAS ANTIANGIOGENESIS METABOLIT SEKUNDER FUNGI
SIMBION SPONS DENGAN METODE CAM (CHORIO ALLANTHOIC
MEMBRANE)**

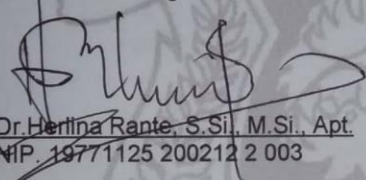
NURUL INAYA MUHTAR

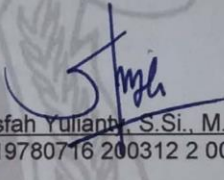
N011 17 1516

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping


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


Dr. Risfah Yulianti, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19780716 200312 2 001

Pada tanggal 30 Maret 2021

LEMBAR PENGESAHAN

**AKTIVITAS ANTIANGIOGENESIS METABOLIT SEKUNDER FUNGI
SIMBION SPONS DENGAN METODE CAM (CHORIO ALLANTHOIC
MEMBRANE)**

**ANTIANGIOGENESIS ACTIVITY OF SECONDARY METABOLITE
FUNGI SYMBIONT SPONS BY CAM (CHORIO ALLANTHOIC
MEMBRANE) METHOD**

Disusun dan diajukan oleh:

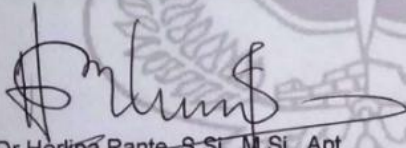
**NURUL INAYA MUHTAR
N011 17 1516**

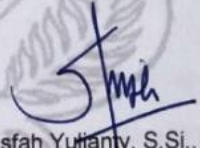
Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Sarjana Fakultas Farmasi Universitas
Hasanuddin
pada tanggal 30 Maret 2020
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping


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


Dr. Risfah Yulianti, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19780716 200312 2 001

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 : Nurul Inaya Muhtar

NIM : N011171516

Program Studi : Farmasi

Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul Aktivitas Atiangiogenesis Metabolit Sekunder Fungi Simbion Spons dengan Metode CAM (*Chorio Allanthoic Membrane*) adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila dikemudian 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, 30 Maret 2021

Yang Menyatakan


Nurul Inaya Muhtar

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas atas berkat, rahmat, dan petunjuk-Nya maka skripsi ini dapat diselesaikan. Berkat bantuan dan dorongan dari berbagai pihak penulis dapat melewati berbagai macam hambatan untuk menyelesaikan skripsi ini. Untuk itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Kedua Orang tua penulis, serta Saudara penulis, Nurul Annisa Muhtar, Muhammad Rasyid Muhtar dan Hasan Zas Muhtar atas segala doa, dukungan moril, materil, dan selalu memberikan semangat kepada penulis.
2. Ibu Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt selaku pembimbing utama dan Ibu Dr.Risfah Yulianty, S.Si., M.Si., Apt. selaku pembimbing pendamping yang telah meluangkan waktu, memberikan ilmu, arahan dan membimbing penulis dalam pembuatan skripsi ini dan membantu penulis menyelesaikan skripsi tepat waktu.
3. Bapak Prof. Dr.Gemini Alam, M.Si., Apt. dan Bapak Muh. Akbar Bahar, S.Si., M.Pharm.Sc., Apt selaku tim penguji yang telah meluangkan waktu untuk memberikan banyak saran dan masukan yang membangun dalam penyelesaian skripsi ini.
4. Bapak Anshar Saud S.Si., M.Sc., Apt. selaku penasehat akademik yang telah memberikan banyak nasehat dan arahan selama penulis menempuh studi di Fakultas Farmasi.

5. Dekan dan para Wakil Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, serta seluruh staf dosen dan pegawai Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas ilmu, motivasi, bantuan, dan segala fasilitas yang diberikan selama penulis menempuh studi hingga menyelesaikan penelitian ini.
6. Teman-teman sepenelitian, Anisah dan Andi Nur Aulia El Firman yang telah membantu penulis dari awal pengerjaan penelitian hingga selesai dan juga dalam menyusun skripsi ini.
7. Teman-teman Kendari Squad, Arfian Junior Amir, Nurul Syamsiyah Al-Kautsar, Suci Ananda Putri, dan Achmad Luthfi, yang telah membantu penulis, memberikan semangat, serta dukungan dalam menyusun skripsi ini.
8. Teman-teman Bebe Squad, Delli Cipta Lestari dan Rifdah Aulia, yang telah menemani penulis, memberikan dukungan, memberikan hiburan dan menjadi pendengar yang baik dari awal menjadi mahasiswa baru fakultas farmasi hingga saat ini serta dukungan dalam menyusun skripsi ini.
9. Teman-teman Anak Basket, yang selalu memberikan semangat dan dukungan kepada penulis, terima kasih telah memberikan banyak kesan, kebersamaan, canda, dan tawa terutama selama proses perkuliahan dan juga selama praktikum.
10. Teman-teman seperjuangan angkatan 2017 Farmasi (CLOSTRIDIAL), terima kasih telah memberikan banyak dukungan,

semangat, dan pengalaman berharga yang tidak terlupakan terutama dalam kepanitiaan, serta membantu dalam mengukir kisah selama kuliah baik di dalam kelas maupun di laboratorium.

11. Teman-teman dari PREFIX 01 yang selalu memberikan perhatian, dukungan, dan semangat kepada penulis dalam menyusun skripsi.

12. Semua pihak yang telah membantu yang tidak sempat disebutkan namanya satu persatu

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

Makassar, 30 Maret 2021

Nurul Inaya Muhtar

ABSTRAK

NURUL INAYA MUHTAR. Aktivitas Antiangiogenesis Metabolit Sekunder Fungi Symbion Spons dengan Metode CAM (*Chorio Allantoic Membrane*) (Herlina Rante dan Risfah Yulianty).

Angiogenesis merupakan proses pertumbuhan dan perkembangan sel, pembentukan pembuluh darah baru yang terjadi secara normal dan berperan dalam proses penyembuhan luka seperti pembentukan jaringan baru setelah mengalami cedera. Angiogenesis juga merupakan langkah penting dalam pertumbuhan sel kanker yaitu karsinogenesis yang memungkinkan sel kanker mendapatkan suplai nutrisi dan oksigen untuk terus berkembang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antiangiogenesis dari ekstrak isolat fungi KDR 02-05 dengan metode *chorio allantoic membrane* (CAM). Ekstrak etil asetat yang diperoleh dari isolat fungi KDR 02-05 diberikan dengan variasi dosis 0,1875; 0,375; 0,75; 1,5 dan 3 μ g, masing-masing diaplikasikan pada cakram kertas yang telah diberi penginduksi (bFGF 10 ng) lalu diimplantasikan ke dalam telur berembrio berusia 9 hari. Selanjutnya telur berembrio tersebut diinkubasi selama 3 hari, lalu dilakukan pengamatan makroskopik dengan menghitung jumlah pembuluh darah yang terbentuk dan diberi skor. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat yang diperoleh dari isolat fungi KDR 02-05 dengan variasi dosis 0,375; 0,75; 1,5 dan 3 μ g mampu menghambat pembentukan pembuluh darah baru dengan respon antiangiogenesis masing-masing sebesar 42; 62; 96; 88 dan 100% . Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa isolat fungi KDR 02-05 berpotensi sebagai agen antiangiogenesis.

Kata Kunci : Angiogenesis, CAM, bFGF, Fungi KDR 02-05

ABSTRACT

NURUL INAYA MUHTAR. Antiangiogenesis Activity Of Secondary Metabolite Fungi Symbiont Spons by CAM (*Chorio Allantoic Membrane*) Method (Herlina Rante dan Risfah Yulianty).

Angiogenesis is the cell growth process and development, new blood cells formation that occurs normally and plays a role in the wound healing process, such as the formation of new tissue after injury. Angiogenesis is also an important step in cancer cells growth, namely carcinogenesis, which allows cancer cells to get a supply of nutrients and oxygen. This study aims to determine the antiangiogenesis activity of the KDR 02-05 fungal isolate extract using the chorio allantoic membrane (CAM) method. Ethyl acetate extract obtained from the KDR 02-05 fungal isolate was given with various doses of 0.1875; 0.375; 0.75; 1.5 and 3 µg, respectively applied to paper discs that have been given an angiogenesis inducer (bFGF 10 ng) then implanted into embryonic eggs aged 9 days. Furthermore the embryonic eggs were incubated for 3 days, and macroscopic observations were performed by counting the number of blood vessels formed and given a score. The result of this study showed that the ethyl acetate extract obtained from the KDR 02-05 fungal isolate with dose variations 0.375; 0.75; 1.5 and 3 µg were able to inhibit the formation of new blood vessels with antiangiogenesis responses of 42, 62, 96, 88 and 100%, respectively. Based on the results, it is concluded that the extract of the KDR 02-05 fungal isolate potentially as antiangiogenesis agent.

Keywords: Angiogenesis, CAM, bFGF, Fungi KDR 02-05

DAFTAR ISI

	halaman
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	v
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	5
I.3. Tujuan Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
II.1. Fungi	6
II.2. Spons	7
II.3. Aktivitas Senyawa Bioaktif yang Bersimbion dengan Spons	8
II.4. Kanker	9
II.5. Angiogenesis	10
II.5.1 Proses Angiogenesis	11
II.6. Faktor Pertumbuhan Fibroblast (<i>Fibroblast Growth Factor</i> ,FGF)	13

II.7. <i>Chorio Allantoic Membrane (CAM)</i>	14
BAB III METODE PENELITIAN	16
III.1. Alat dan Bahan	16
III.2. Metode Kerja	16
III.2.1 Sampel	16
III.2.2 Peremajaan Isolat Fungi KDR 02-05	16
III.2.2.1 Pembuatan medium <i>Potato Dextrosa Agar (PDA)</i>	16
III.2.2.2 Inokulasi Isolat	17
III.2.3 Fermentasi Isolat Fungi Simbion	17
III.2.3.1 Pembuatan medium <i>Potato Dextrosa Broth (PDB)</i>	17
III.2.3.2 Fermentasi	17
III.2.4 Ekstraksi Hasil Fermentasi	17
III.2.5 Uji Antiangiogenesis	18
III.2.5.1 Sterilisasi alat	18
III.2.5.2 Preparasi sediaan uji	18
III.2.5.3 Uji aktivitas angiogenesis	19
III.2.5.4 Analisis data	21
III.2.5.5 Pengambilan kesimpulan	22
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	23
IV.1. Peremajaan Fungi KDR 02-05	23
IV.2. Fermentasi dan Ekstraksi Fungi Simbion	24
IV.3. Uji Antiangiogenesis	25

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	32
V.1. Kesimpulan	32
V.2. Saran	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	37

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Hasil pengamatan respon antiangiogenesis	31

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Isolat fungi KDR 02-05 yang diinkubasi selama 4 hari	23
2. Respon angiogenesis kelompok kontrol	26
3. Isolat fungi KDR 02-05	39
4. Hasil fermentasi	39
5. Proses ekstraksi	39
6. Hasil ekstraksi	39
7. Kontrol <i>Paper disc</i>	40
8. Kontrol bFGF	40
9. Kontrol DMSO	40
10. Kontrol DMSO + bFGF	40
11. 3 µg ekstrak uji + bFGF	41
12. 1,5 µg ekstrak uji + bFGF	41
13. 0,75 µg ekstrak uji + bFGF	41
14. 0,375 µg ekstrak uji + bFGF	41
15. 0,1875 µg ekstrak uji + bFGF	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema Kerja Penelitian	37
2. Dokumentasi Penelitian	39
3. Data Hasil Analisis Statistika	43

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Angiogenesis adalah proses pertumbuhan pembuluh darah baru yang berkembang dari pembuluh darah yang sudah ada sebelumnya. Angiogenesis juga berperan dalam pertumbuhan sel kanker karena dengan terbentuknya pembuluh darah baru yang tidak terkendali memungkinkan sel kanker mendapatkan suplai nutrisi dan juga oksigen untuk terus berkembang (Huang *et al.*, 2016).

Kanker merupakan penyakit yang diakibatkan pertumbuhan tidak normal sel jaringan tubuh yang berubah menjadi sel kanker (Bott, 2014). Sel yang memiliki beberapa kemampuan yaitu mampu menghindari kematian sel, mampu memicu pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) dan juga mampu mengadakan invasi dan metastatis (Sayekti and Taufiq Qurrohman, 2018). Penyakit Kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama di seluruh dunia. Pada tahun 2016, sekitar 16,3% kematian disebabkan oleh kanker (WHO, 2018).

Berdasarkan frekuensi kejadian penyakit kanker yang cukup tinggi, usaha yang dilakukan untuk pengobatan maupun pencegahan penyakit kanker semakin penting (Rahayu *et al.*, 2012). Pengobatan penyakit kanker melalui penghambatan angiogenesis lebih efektif dibandingkan

dengan membunuh sel kanker secara langsung (Sayekti and Taufiq Qurrohman, 2018).

Antiangiogenesis merupakan salah satu terapi yang dapat menghentikan pembentukan pembuluh darah baru pada sel kanker, karena tanpa pembuluh darah baru yang menyuplai nutrisi dan oksigen maka sel kanker akan mati. Terapi penghambatan terhadap angiogenesis dapat digunakan sebagai terapi alternatif yang perlu dikembangkan (Widyaningsih, 2013).

Salah satu upaya yang dilakukan oleh para peneliti untuk mendapatkan ketersediaan bahan obat untuk penyakit kanker adalah dengan memanfaatkan bahan alam yang berasal dari laut (Losung *et al.*, 2015). Salah satu sumber senyawa bioaktif dari laut adalah mikroorganisme yang bersimbion dengan spons yang kaya akan mikroorganisme seperti bakteri dan fungi.(Marzuki, 2018)

Fungi dari organisme laut merupakan sumber keanekaragaman kimia baru yang berlimpah dan lebih dari 1000 produk alami baru yang diproduksi dengan beberapa aktivitas farmakologis yang signifikan secara klinis. Produk metabolit sekunder dari fungi yang terdapat dalam laut memungkinkan memiliki manfaat yang penting dalam bidang farmasi seperti antibakteri, antijamur, antikanker serta antioksidan (Chari *et al.*, 2019).

Interaksi antara spons dengan mikroorganisme terjadi dalam bentuk simbiosis komensalisme yang menghasilkan senyawa bioaktif.

Metabolit yang dihasilkan oleh mikroba yang berasosiasi dengan spons memiliki kemiripan struktur dengan metabolit yang dihasilkan inangnya. Sejauh ini, beberapa penelitian ilmiah telah dilakukan mengenai senyawa yang terdapat dalam spons dan menunjukkan perolehan senyawa yang memiliki aktivitas biologik yang tinggi sebagai antikanker (Marzuki, 2018).

Penelitian yang dilakukan oleh Mutia, 2019 menunjukkan bahwa salah satu jamur dari spons laut memiliki aktivitas sitotoksik dan berpotensi sebagai sumber senyawa antikanker. Ekstrak etil asetat fungi simbiosis spons yang berasal dari salah satu kepulauan Indonesia memiliki aktivitas sebagai antikanker pada konsentrasi 300, 150, 75, 37.5 dan 18.75 ppm (Handayani *et al.*, 2018).

Salah satu metode yang telah banyak digunakan untuk menilai efektivitas dari suatu senyawa sebagai antiangiogenesis adalah dengan menggunakan metode *Chorio Allantoic Membrane* (CAM) (Yuan *et al.*, 2014). Pengujian dengan menggunakan metode CAM menggunakan telur ayam berembrio serta menggunakan larutan bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) sebagai penginduksi angiogenesis (Salamah *et al.*, 2010). bFGF merupakan salah satu faktor penginduksi yang berperan penting dalam memediasi proses angiogenesis, pembentukan tumor dan juga penyembuhan luka (Frisca *et al.*, 2009).

Metode CAM merupakan pengujian yang memiliki hasil yang konsisten dengan motilitas sel kanker dan invasi yang diamati dalam tes *in vivo*. Pada umumnya, pengujian menggunakan tikus merupakan target

uji terapi baru pada kanker. Namun, model hewan memakan biaya dan waktu sedangkan pengujian menggunakan CAM adalah metode yang efisien digunakan, hemat biaya serta memungkinkan skrining skala besar dan merupakan model *in vivo* yang mudah direproduksi untuk mempelajari perkembangan sel kanker (Noor A Lokman *et al.*, 2012).

Sampel penelitian yang digunakan adalah isolat Fungi KDR 02-05 yang sebelumnya telah diisolasi dari spons *Callyspongia (Clasdiochadia) aerizusa* yang berasal dari perairan pulau Kodingareng keke (Mathar, 2020). Isolat Fungi KDR 02-05 yang digunakan merupakan genus *Penicillium* Sp. yang telah diidentifikasi secara makroskopik dan mikroskopis (Mathar, 2020). Berdasarkan hasil penelitian Bladt *et al.*, 2013 *Penicillium* Sp. memiliki senyawa asperphenamate, ligiren dan fudecadione yang berpotensi sebagai antikanker.

Berdasarkan uraian di atas, diharapkan Fungi Symbion KDR 02-05 memiliki aktivitas antiangiogenesis yang diuji menggunakan metode *Chorio Allantoic Membrane* (CAM).

I.2 Rumusan Masalah

Apakah metabolit sekunder yang diperoleh dari isolat Fungi KDR 02-05 simbion spons memiliki aktivitas antiangiogenesis ?

I.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas Antiangiogenesis isolat Fungi KDR 02-05 simbion spons menggunakan metode CAM.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Fungi

Fungi merupakan organisme eukariotik yang tidak berklorofil dan tumbuh seperti benang, benang tunggal atau bercabang yang disebut *hife* dan *hife* ini akan membentuk suatu kumpulan yang disebut dengan miselium (miselia). *Hife* terdiri dari dua macam yaitu *hife* fertile dan vegetative. Secara umum fungi dikelompokkan menjadi dua kelompok berdasarkan tipe selnya yaitu fungi yang bersifat uniseluler (Khamir; ragi, yeast) dan multiseluler (kapang; jamur, cendawan) (Djide dan Sartini, 2006).

Fungi memiliki ciri-ciri yang spesifik, antara lain: berkembang biak secara seksual dan aseksual, memiliki spora dan menghasilkan spora, tidak mempunyai klorofil sehingga tidak dapat melakukan fotosintesis dan bersifat saprofit (Agusta, 2017). Habitat penyebaran fungi di alam sangat luas yaitu terdapat di dalam tanah, buah-buahan, bahan organik, bahan makanan hingga terdapat di air dan air laut (Djide dan Sartini, 2006).

Fungi dapat bersifat obligat, yaitu tumbuh bersporulasi di laut, atau bersifat fakultatif, yaitu berasal dari lingkungan air tawar atau darat yang mampu tumbuh dan juga bersporulasi di lingkungan laut. Kondisi lingkungan yang ekstrim di laut seperti salinitas tinggi, tekanan tinggi, variasi suhu, kompetisi dengan bakteri, virus dan jamur lain dapat

menyebabkan fungi laut mampu mengembangkan senyawa metabolit spesifik yang berbeda dengan jamur terrestrial (Ayer *et al.*, 2018).

Fungi yang terdapat di air laut yang bersimbion dengan spons merupakan mikroorganisme simbion selain bakteri yang berpotensi sebagai sumber senyawa metabolit sekunder. Fungi simbion spons menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang berpotensi dalam bidang farmakologi (Ayer *et al.*, 2018).

II.2 Spons

Spons merupakan organisme laut invertebrata yang berasal dari filum porifera. Spons sebagai salah satu hewan primitif yang hidup menetap dan bersifat *filter feeder* (menyaring makanan). Spons terdiri dari 4 kelas yaitu *Calcarea*, *Demospongiae*, *hexactinellida* dan *Sclerospongia*. Habitat spons umumnya adalah menempel pada pasir, batu-batuan dan karang yang telah mati. Makanan spons berupa bakteri dan plankton (Haedar *et al.*, 2016).

Pertumbuhan dan perkembangan dari spons dipengaruhi oleh perbedaan kondisi lingkungan seperti tingginya kekuatan ionik pada air laut, intensitas cahaya, pengaruh rendahnya temperature, tekanan struktur tubuh yang berbeda, cara hidup serta nutrisi yang dibutuhkan (Marzuki, 2018).

Callyspongia sp. Adalah salah satu jenis spons yang populasinya banyak di perairan Indonesia. Spesies ini memiliki berbagai kandungan metabolit sekunder yang nantinya dapat dimanfaatkan sebagai bahan

baku obat dalam industri farmasi. Beberapa metabolit sekunder yang terdapat pada *Callyspongia* sp. Diantaranya steroid, flavonoid, terpenoid dan alkaloid yang berpotensi sebagai antibakteri, antijamur hingga antikanker (Menggelea *et al.*, 2015).

II.3 Aktivitas Senyawa Bioaktif yang bersimbiosis dengan spons

Spons merupakan biota laut yang menduduki tempat teratas sebagai penghasil senyawa bioaktif seperti alkaloid, terpenoid, acetogenin, senyawa nitrogen, halidan siklik dan lain-lain. Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh spons merupakan hasil metabolisme sekunder dari spons. Hasil metabolisme sekunder ini memiliki aktivitas sebagai antimikroba, antivirus dan antikanker yang berguna sebagai bahan baku pembuatan obat (Marzuki, 2018).

Organisme mati yang diserap oleh spons berfungsi ganda yakni selain dijadikan makanan, mikroorganisme juga dijadikan simbon dari spons karena mikroorganisme memakai tubuh spons yang berpori sebagai tempat hidup dan perlindungan. Interaksi antara spons dan mikroorganisme terjadi dalam bentuk simbiosis komensalisme dimana dalam interaksi ini dihasilkan senyawa bioaktif (Marzuki, 2018).

Metabolit yang dihasilkan oleh mikroba yang berasosiasi dengan spons memiliki kemiripan struktur dengan metabolit yang dihasilkan inangnya. Sejauh ini, beberapa penelitian ilmiah telah dilakukan mengenai senyawa yang terdapat dalam spons dan menunjukkan perolehan

senyawa yang memiliki aktivitas biologik yang tinggi sebagai antikanker (Marzuki, 2018).

Senyawa yang dihasilkan oleh fungi yang bersimbion dengan spons memiliki berbagai potensi sehingga diaplikasikan dalam dunia kesehatan dan telah dibuktikan memiliki banyak sumber metabolit sekunder aktif yang unik secara sktruktur. Karena mikroorganisme laut mampu bertahan di bawah kondisi lingkungan yang ekstrim maka diperkirakan bahwa mikroorganimse tersebut memiliki kemampuan untuk mensintesis senyawa kimia tertentu untuk mempertahankan diri dari kondisi lingkungan yang ekstrim (Ayer *et al.*, 2018).

II.4 Kanker

Kanker hingga saat ini masih merupakan penyebab kematian terbanyak kedua di dunia. Pada tahun 2016, sekitar 16,3% kematian disebabkan oleh kanker (WHO, 2018). Kanker adalah penyakit yang ditandai dengan hilangnya mekanisme kontrol normal yang mengatur kesintasan, poliferasi dan diferensiasi. (Katzung *et al*, 2014). Sel kanker ini mampu menyerang dan merusak jaringan lainnya (Parwata, 2014).

Sifat umum yang dimiliki sel kanker adalah pertumbuhannya yang berlebihan, bersifat invasif yaitu mampu tumbuh di jaringan sekitarnya, bersifat metastatic yaitu menyebar ke tempat lain dan menyebabkan pertumbuhan baru serta pergeseran metabolisme kearah pembentukan makromolekul dari nukleosida dan asam amino serta peningkatan katabolisme karbohidrat untuk energi sel (Gunawan, 2016).

II.5 Angiogenesis

Proses pertumbuhan dan perkembangan sel, pembentukan pembuluh darah baru yang terjadi secara normal sangat dibutuhkan. Pembentukan pembuluh darah baru ini disebut dengan istilah angiogenesis. Angiogenesis juga berperan dalam proses penyembuhan luka seperti pembentukan jaringan baru setelah mengalami cedera. Angiogenesis penting dalam proses pembentukan pembuluh darah baru yang dibutuhkan oleh tubuh jadi dikatakan bersifat fisiologi tetapi angiogenesis juga merupakan langkah penting dalam pertumbuhan sel kanker yaitu kasiogenesis atau dapat dikatakan angiogenesis dapat pula bersifat patologis (Parwata, 2014).

Angiogenesis dapat dikatakan bersifat patologis apabila terjadi pembentukan pembuluh darah baru yang tidak normal atau tidak terkendali dalam tubuh, dimana tubuh akan kehilangan control dalam mengatur keseimbangan sekresi angiogenik stimulator dan inhibitor. Sel kanker akan memproduksi *angiogenics growth factor* yang berlebihan dimana akan mengakibatkan efek angiogenik inhibitor berkurang hingga tidak ada sama sekali. Sebagai akibatnya akan terjadi pembentukan pembuluh darah baru dengan sangat cepat dalam pola yang tidak terkendali (Parwata, 2014).

Dalam beberapa penelitian terkait pembentuk, pertumbuhan dan metastasis tumor, komponen penting yang perlu diketahui pada proses ini adalah vaskularisasi untuk menyediakan

kebutuhan nutrisi serta oksigen agar sel tumor dapat mengalami extravasasi yaitu migrasi sel kanker dari sirkulasi darah menuju ke organ tubuh lainnya. Hipotesis yang dikemukakan adalah tumor berkembang tanpa vaskularisasi yang cukup hal ini dapat memicu terjadinya hipoksia lokal dan mengakibatkan vaskularisasi yang dependen terhadap hipoksia. Keadaan tumor ini yang akan meningkatkan level dari growth factor dan berakibat dalam pertumbuhan tumor yang terus menerus (Dudek *et al.*, 2010).

II.5.1 Proses angiogenesis

Proses terjadinya angiogenesis terbagi dalam beberapa tahap yaitu (Frisca *et al.*, 2009) :

1. Pelepasan stimulus angiogenesis. Pada saat kumpulan sel mengalami luka atau hipoksia akan melepaskan faktor angiogenik (berupa faktor pertumbuhan dan protein rantai pendek lainnya) yang akan berdifusi ke sel-sel sekitar.
2. Pelepasan enzim protease dari sel endotel yang teraktivasi. Faktor angiogenik yang dikeluarkan akan berikatan dengan reseptornya yang terdapat pada reseptor sel endotel (EC) disekitar lokasi pembuluh darah lama. Sementara itu, sel endotel akan teraktivasi dan menghasilkan signal yang dikirim dari permukaan sel ke nukleus. Organel sel endotel selanjutnya akan memproduksi molekul baru seperti enzim protease yang berperan dalam

degradasi matriks ekstraseluler untuk mengakomodasi percabangan pembuluh darah baru.

3. Disosiasi sel endotel dan degradasi ECM yang melapisi pembuluh darah lama. Disosiasi sel endotel dari sel-sel di sekitarnya, yang didorong oleh faktor pertumbuhan angiopoietin serta aktivitas enzim-enzim yang dihasilkan oleh sel endotel yang teraktivasi dibutuhkan untuk menginisiasi terbentuknya pembuluh darah baru. Dengan sistem enzimatik tersebut, sel endotel dari pembuluh darah lama akan mendegradasi ECM dan menginvasi stroma dari jaringan-jaringan sekitarnya sehingga sel-sel endotel yang terlepas dari ECM akan sangat reponsif terhadap signal angiogenik.
4. Migrasi dan proliferasi sel endotel. Degradasi yang terjadi sebelumnya diikuti dengan migrasinya sel endotel ke matriks yang terdegradasi. Proses ini diikuti dengan proliferasi sel endotel yang distimulasi oleh faktor angiogenik, yang diantaranya dilepaskan dari hasil degradasi ECM.
5. Pembentukan lumen dan pembuatan ECM baru. Sel endotel yang sebelumnya bermigrasi akan mengalami elongasi dan saling menjajarkan diri dengan sel endotel lain untuk membuat struktur percabangan pembuluh darah baru yang kuat. Proliferasi dari sel endotel meningkat sepanjang percabangan vascular. Lumen kemudian terbentuk dengan pembengkokan dari sel-sel endotel.

6. Fusi pembuluh darah baru dan inisiasi aliran darah. Struktur pembuluh darah yang telah terhubung satu sama lain akan membentuk rangkaian pembuluh darah untuk memediasi terjadinya sirkulasi darah. Pada tahap ini, sel mural (sel otot polos dan *pericytes*) akan membantu menstabilkan sebagai jaringan penyangga dari pembuluh darah yang baru terbentuk.

Dalam proses pembentukan pembuluh darah baru, dibutuhkan beberapa faktor penginduksi angiogenesis. Dari beberapa faktor penginduksi, ada dua yang terpenting untuk proses pembentukan pembuluh darah baru yaitu fibroblast basa (*basic Fibroblast Growth Factor*, bFGF) dan faktor pertumbuhan endotel vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF). Faktor pertumbuhan ini akan mengakibatkan proliferasi sel endotel, peningkatan permeabilitas vascular dan migrasi sel endotel yang penting dalam tahap angiogenesis (Parwata, 2014).

II.6 Faktor pertumbuhan fibroblast (*Fibroblast Growth Factor*, FGF)

Fibroblast Growth Factor (FGF) merupakan salah satu faktor angiogenik yang terdiri dari 28 anggota. Terdapat dua struktur primer asam amino dari FGF yaitu acidFGF atau aFGF dan basicFGF atau bFGF. aFGF merupakan hasil fraksinasi FGF pada kondisi pH asam sedangkan bFGF merupakan hasil fraksinasi FGF pada kondisi basa. bFGF terdapat pada membrane basal, matriks ekstraseluler, sub endotel dan pembuluh darah. bFGF berperan dalam pembentukan tumor,

penyembuhan luka serta berperan penting dalam proses angiogenesis. diketahui bahwa faktor angiogenik ini dapat menstimulasi proliferasi sel endotel secara *in vitro* dan juga proses angiogenik *in vivo* pada konsentrasi 10 ng (Frisca *et al.*, 2009).

Mekanisme yang terjadi pada pelepasan bFGF sebagai *growth factor*, yaitu bFGF berinteraksi dengan sel endotelial melalui reseptor *tyrosine kinase* dan reseptor *heparine sulfate proteoglycan* (HSPGs) di permukaan sel. Keseimbangan antara penyimpanan dan pelepasan bFGF di matriks ekstra seluler mungkin adalah suatu pengaturan efek biologi dari faktor pertumbuhan di endothelium (Widyaningsih, 2013).

II.7 Chorio Allantoic Membrane (CAM)

Chorio Allantoic Membrane atau CAM merupakan membrane ekstraembrionik. Membrane ekstraembrionik ini memiliki fungsi sebagai wadah tempat pertukaran gas dan nutrisi untuk pertumbuhan embrio yang dibantu oleh jaringan kapiler. Selain itu, CAM terlibat dalam transportasi kalsium dari kulit telur, homeostasis asam-basa dalam embrio serta reabsorpsi ion dan air dari *chorio allantoic* (Yuan *et al.*, 2014)

CAM merupakan metode penelitian yang tepat digunakan sebagai pengujian aktivitas angiogenesis atau aspek potensi angiogenik dikarenakan memiliki karakteristik fungsional angiogenesis *in vivo*, vaskularis yang luas, aksesibilitasnya yang mudah serta pengujian dengan menggunakan metode ini memiliki biaya yang relatif rendah (Yuan *et al.*, 2014).

Metode CAM telah banyak digunakan untuk berbagai pengujian seperti aktivitas angiogenesis, invasi sel tumor dan metastasis. CAM terdiri dari 3 lapisan yaitu sel epitel, lapisan mesodermal dan epitel allantois. CAM juga mengandung beberapa protein yang menyerupai lingkungan fisiologis sel kanker seperti fibronrktin, laminin, kolagen tipe I dan integrin (Noor A. Lokman *et al.*, 2012).

CAM merupakan membrane ekstraembrionik yang awalnya terbentuk dari fusi korion dan allantois pada hari ke-4 inkubasi. pembuluh darah belum matang dan masih kekurangan sel otot polos hingga pertumbuhan sangat cepat hingga hari ke-8 dan menimbulkan plesus kapiler yang terikat erat dengan sel epitel korionik diatasnya untuk serta memediasi pertukaran gas dengan lingkungan luar. Poliferasi kapiler yang cepat berlanjut hingga hari ke-11. Setelah itu, indeks mitosis sel endotel menurun dengan cepat dan sistem vascular berhenti hingga hari ke-18 tepat sebelum menetas (Ribatti, 2010).