

**EFEK ANTIANGIOGENESIS FRAKSI VI dan VII EKSTRAK METANOLIK KAYU SECANG
(*Caesalpinia sappan* L.)**

Imam Purnomo Sugiarto¹, Nunuk Aries Nurulita^{1*}, Dwi Hartanti¹

Fakultas Farmasi Universitas muhammadiyah Purwokerto

Alamat Korespondensi: nunuknurulita@yahoo.com

ABSTRAK

Penghambatan proses angiogenesis merupakan salah satu strategi menghambat perkembangan kanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antiangiogenesis fraksi VI dan VII ekstrak metanolik kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) menggunakan model pembuluh darah pada mata tikus. Mata tikus diberi perlakuan bFGF (induktor angiogenesis) dan ekstrak metanolik kayu secang selama 8 hari selanjutnya diamati respon angiogenesisnya. Berdasarkan penelitian yang dilakukan didapatkan hasil ekstrak metanolik kayu secang mampu menghambat angiogenesis pada mata tikus. Respon angiogenesis untuk fraksi VI dosis 200, 400 µg/mL dan fraksi VII dosis 500, 1000 µg/mL masing-masing secara berurutan adalah sebesar (dalam %) $5 \pm 7,07$; 0 ± 0 ; $6,25 \pm 8,83$; $8,33 \pm 0$. Hasil ini menunjukkan bahwa fraksi VI dan VII ekstrak metanolik kayu secang memiliki efek antiangiogenesis.

Kata kunci: antiangiogenesis, mata tikus, *Caesalpinia sappan* L.

ABSTRACT

*Inhibition of angiogenesis has become a strategy to inhibit cancer development. The aim of the research is to investigate antiangiogenesis effect of 6th and 7th fractions of secang wood methanol extract (*Caesalpinia sappan* L.) in situ using rat eyes. Rat eyes were treated with b-FGF (angiogenesis inductor) and extracts during eight days to observe its angiogenesis response. The results showed that the secang wood methanol extracts could inhibit angiogenesis in rat eyes. Doses 200, 400 µg/mL of 6th fraction and doses 500, 1000 µg/mL of 7th fraction gave angiogenesis response of (in percent) 5 ± 7.07 ; 0 ± 0 ; 6.25 ± 8.83 ; 8.33 ± 0 , respectively. These results indicate that the fractions have antiangiogenic effect.*

Key words: antiangiogenic, rat eyes, Caesalpinia sappan L.

Pendahuluan

Angiogenesis adalah proses pertumbuhan pembuluh darah baru yang merupakan percabangan

pembuluh darah yang sudah ada pada jaringan tubuh. Angiogenesis dapat terjadi pada individu normal, contohnya pada proses penyembuhan luka,

pertumbuhan embrio pada kehamilan, dan pada siklus menstruasi (Li *et al.*, 2009). *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) merupakan peptida yang sangat berpotensi dalam proses angiogenesis (Pradeep *et al.*, 2005). Tubuh mengalami kehilangan kendali terhadap proses angiogenesis pada beberapa penyakit. Pada keadaan ini, pembuluh darah baru akan tumbuh pada jaringan normal (Li *et al.*, 2009). Pada kasus tumor, pertumbuhan dan metastasis tumor bergantung kepada keberlangsungan proses angiogenesis (Daly *et al.*, 2003). Angiogenesis mempunyai peranan penting dalam metastasis kanker, fase di mana sel kanker mampu melakukan invasi ke dalam jaringan sekitarnya dan seterusnya ke pembuluh darah (Bandaso, 2008). Tahap metastasis ini merupakan tahap paling kritis yang menyebabkan gejala klinis dan bahkan kematian (King, 2000).

Terapi antiangiogenesis dilakukan dengan mencegah dan menghambat pertumbuhan pembuluh darah baru (Morabito *et al.*, 2006). Sasaran dari terapi ini dapat melalui beberapa pendekatan seperti penghambatan proses proliferasi sel, penghambatan migrasi sel, dan

penghambatan ekskresi VEGF dan FGF. Diduga bahwa apabila ada agen kimia yang mampu menghambat angiogenesis, maka agen kimia tersebut berpotensi besar dalam terapi pengobatan berbagai penyakit, termasuk kanker (Ribatti *et al.*, 1997).

Secang (*Caesalpinia sappan* L.) merupakan tumbuhan yang sudah digunakan oleh masyarakat sebagai tanaman obat untuk antiinflamasi dan obat penyakit kanker. Beberapa penelitian yang telah dilakukan, diketahui bahwa ekstrak metanol air, n-butanol serta kloroform dari kayu secang dapat membunuh beberapa jenis sel kanker secara in-vitro (Wicaksono *et al.*, 2008). Penelitian lain membuktikan bahwa ekstrak metanol kayu secang mampu menghambat telomerase, suatu enzim yang dibutuhkan sel kanker untuk menjadi *immortal* (Lee *et al.*, 2007). Kayu secang juga memiliki banyak kandungan senyawa fenolik dan flavonoid yang mempunyai sifat-sifat antioksidan. Brazilin merupakan komponen aktif dari kayu Secang yang memiliki aktivitas antikanker tersebut. Brazilin diketahui selain memiliki aktivitas antioksidan (Badami *et al.*, 2003), juga memiliki aktivitas antiinflamasi (Sasaki *et al.*,

2006). Kayu Secang juga telah diketahui mempunyai aktivitas antiproliferatif pada 2 (dua) sel kanker metastasis, yaitu HT-1080 dan LLC (*Murine Lewis Lung Carcinoma*) (Ueda *et al*, 2002). Selain itu, ekstrak metanol dan ekstrak metanol air kayu secang terbukti memiliki aktivitas sitotoksik (Abdullah dan Mahdalena, 2006) dan mampu memacu apoptosis terhadap sel kanker payudara T47D (Nurulita, 2005).

Penelitian ini penting dilakukan untuk memperoleh data ilmiah bahwa kayu secang dapat menghambat pertumbuhan pembuluh darah baru sehingga dapat mendukung potensinya sebagai antikanker. Sampai sejauh ini belum banyak dilakukan penelitian yang mengungkap potensi antiangiogenesis kayu secang. Penelitian ini dirancang untuk mengetahui apakah ekstrak metanolik kayu secang mempunyai efek antiangiogenesis dengan model pembuluh darah pada mata tikus.

Metodologi Penelitian

Alat dan Bahan

Kayu secang diperoleh di BP2TO2T (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional), Tawangmangu. Bahan yang digunakan dalam penelitian

ini adalah serbuk kering kayu secang, kayu secang diambil yang tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda, kemudian diserut kecil. Pengeringan dilakukan dengan cara ditutupi dengan kain hitam supaya tidak terkena sinar matahari langsung. Simplisia yang telah kering (dengan memperhatikan persyaratan kandungan air maksimal dalam simplisia) diserbuk dan ditempatkan dalam botol coklat yang kering. Selain itu bahan yang digunakan antara lain tikus *Rattus norvegicus*, fraksi VI dan VII ekstrak metanolik kayu secang, bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), metanol, aquades, DMSO teknis, butanol, asam asetat, etil asetat, petroleum eter, kloroform, rutin standar (zigma).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kandang tikus, mikropipet (Socorex), alat-alat gelas (pirex), timbangan elektrik (shimadzu), kamera digital 7,2 MP (Sony), pipa kapiler, peralatan KLT.

Jalannya penelitian

Pengumpulan alat dan bahan

Simplisia kayu secang diperoleh dengan cara memesan di BP2TO2T Tawangmangu, Jawa Tengah.

Pembuatan dan pemisahan ekstrak metanolik kayu secang

Ekstrak metanol diperoleh dengan cara maserasi bertingkat dengan pelarut petroleum eter, kloroform, dan metanol selama 5 hari. Kemudian setelah mendapat ekstrak cair diuapkan pelarutnya dengan evaporator sampai didapat ekstrak yang kental, kemudian setelah kental tambahkan silika gel lalu diuapkan kembali dengan evaporator sampai didapat ekstrak yang kering. Ekstrak kering yang telah didapat dilakukan fraksinasi dengan metode kromatografi kolom dengan fase diam silika gel dan fase gerak yang diatur tingkat kepolarannya berdasar pada deret elutropik yaitu PE-kloroform-metanol. Fraksi-fraksi yang ada ditampung, kemudian diuapkan kembali pelarutnya. Saat pelarut tersisa sedikit pindahkan dalam flakon sambil diusahakan pelarut agar tetap dapat menguap (Kinasih, 2008).

Pembuatan larutan uji

Sebanyak 10 mg fraksi ekstrak metanolik kayu secang Ditimbang kemudian dilarutkan ke dalam 100 μ L DMSO lalu dihomogenkan hingga larut sempurna. Larutan fraksi ekstrak metanolik kayu Secang tadi sebagai larutan stok dengan konsentrasi 100.000 μ g/mL. Lalu dilakukan

pengenceran kembali untuk mendapat seri kadar yang ditentukan dengan menggunakan pelarut aquades.

Uji antiangiogenesis

Tikus dibagi dalam 7 kelompok, setiap kelompok berisi 2 ekor tikus.

Kelompok I adalah kontrol negatif (tidak diberi apa-apa).

Kelompok II adalah kontrol bFGF (diberi protein bFGF).

Kelompok III adalah kontrol pelarut (diberi protein bFGF dan aquades).

Kelompok IV adalah kontrol pemberian fraksi 6 dengan konsentrasi 200 μ g/mL.

Kelompok V adalah kontrol pemberian fraksi 6 dengan konsentrasi 400 μ g/mL.

Kelompok VI adalah kontrol pemberian fraksi 7 dengan konsentrasi 500 μ g/mL.

Kelompok VII adalah kontrol pemberian fraksi 7 dengan konsentrasi 1000 μ g/mL.

Semua kelompok tikus diberi air minum dan bahan pakan yang sama. Sebelum percobaan, tikus diadaptasikan terlebih dahulu dengan kondisi kandang dan laboratorium selama \pm 1 minggu. Pemberian bFGF, aquades maupun fraksi ekstrak metanolik kayu secang dengan cara diteteskan pada kedua mata tikus masing-masing sebanyak 10 μ l.

Analisis

Pengamatan dilakukan setiap pagi hari selama 9 hari percobaan. Data berupa pembuluh baru yang tumbuh pada mata tikus diamati dan difoto untuk pengamatan makroskopis untuk kemudian dibandingkan antara kontrol dan perlakuan sampel. Data yang diperoleh dianalisa secara semikuantitatif.

Hasil dan Pembahasan

Identifikasi fraksi ekstrak metanolik kayu secang

Fraksi yang diperoleh lalu dilakukan uji kualitatif menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan sistem KLT menggunakan lempeng KLT silika gel F₂₅₄.

Identifikasi Flavonoid

Fase diam yang digunakan ialah silika gel F₂₅₄, fase gerak butanol : asam asetat : aquadest (6: 1: 3). Bercak yang timbul disemprot dengan pereaksi semprot sitroborat, kemudian dideteksi dengan sinar ultraviolet 366 nm.

Identifikasi Alkaloid

Fase diam yang digunakan ialah silika gel F₂₅₄, fase gerak butanol : asam asetat : aquadest (6: 1: 3). Bercak yang timbul disemprot dengan pereaksi semprot dragendorf, kemudian

dideteksi dengan sinar ultraviolet 366 nm.

Hasil dan Pembahasan

Fraksinasi Ekstrak Metanolik Kayu Secang

Proses fraksinasi dilakukan untuk memperoleh senyawa yang terkandung di dalam ekstrak. Sebanyak 15 gram ekstrak kering kayu secang yang telah berbentuk serbuk halus difraksinasi dengan menggunakan kromatografi kolom gravitasi. Prinsip dari kromatografi kolom ini adalah reaksi adsorpsi dan kecepatan aliran eluasinya tergantung dengan gaya gravitasi bumi.

Fase diam yang digunakan pada kromatografi kolom ini adalah silika gel, sedangkan fase gerak yang digunakan adalah pelarut dengan kepolaran yang semakin meningkat yaitu PE-kloroform-metanol. Hasil dari fraksinasi diperoleh 17 fraksi yang dikelompokkan berdasarkan pola kromatogram hasil KLT, fraksi yang memiliki kromatogram sama digabung, sehingga dipilihlah fraksi VI dan VII untuk diujikan.

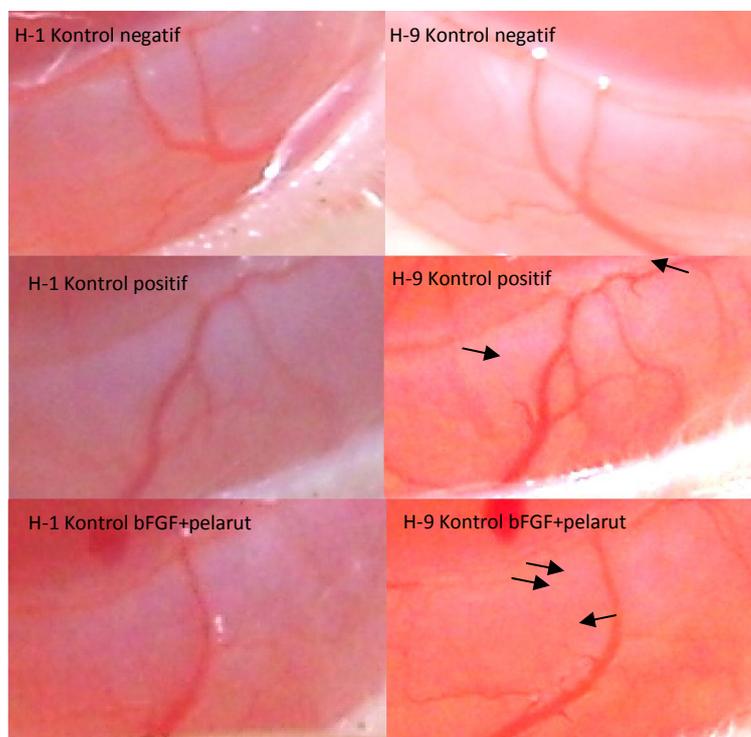
Induksi angiogenesis oleh bFGF

Metode yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan prosedur uji antiangiogenesis daun sambung nyawa (Ermawati, 2004). Metode ini

dimodifikasi dengan mengganti hewan uji mencit menjadi tikus. Mata tikus dinilai lebih mudah diamati daripada mencit. Pada penelitian ini respon angiogenesis adalah jumlah pembuluh darah baru yang terbentuk pada sklera mata.

Pembuluh darah yang terbentuk pada tikus diamati pada hari

ke-7 setelah pemberian bFGF. Pada hari ke-7 sudah terlihat perbedaan respon angiogenesis antara kontrol negatif dan kontrol bFGF. Kontrol bFGF menunjukkan pertumbuhan pembuluh darah baru yang lebih banyak (Ermawati, 2004).



Gambar 5. Pengamatan makroskopik respon angiogenesis antar kelompok kontrol.

Pada penelitian ini pengamatan angiogenesis tidak dilakukan pada daerah kornea tetapi pada sklera mata. Pengamatan dilakukan dengan merekam gambar sklera mata menggunakan kamera digital untuk

kemudian diamati hasilnya. Kondisi pengamatan seperti cahaya juga mempengaruhi hasil pengamatan. Mata tikus diberi perlakuan seperti yang diuraikan pada metode, kemudian pembuluh darah baru yang terbentuk

dikuantifikasi. Data yang ditampilkan mewakili sampel pada masing-masing kelompok.

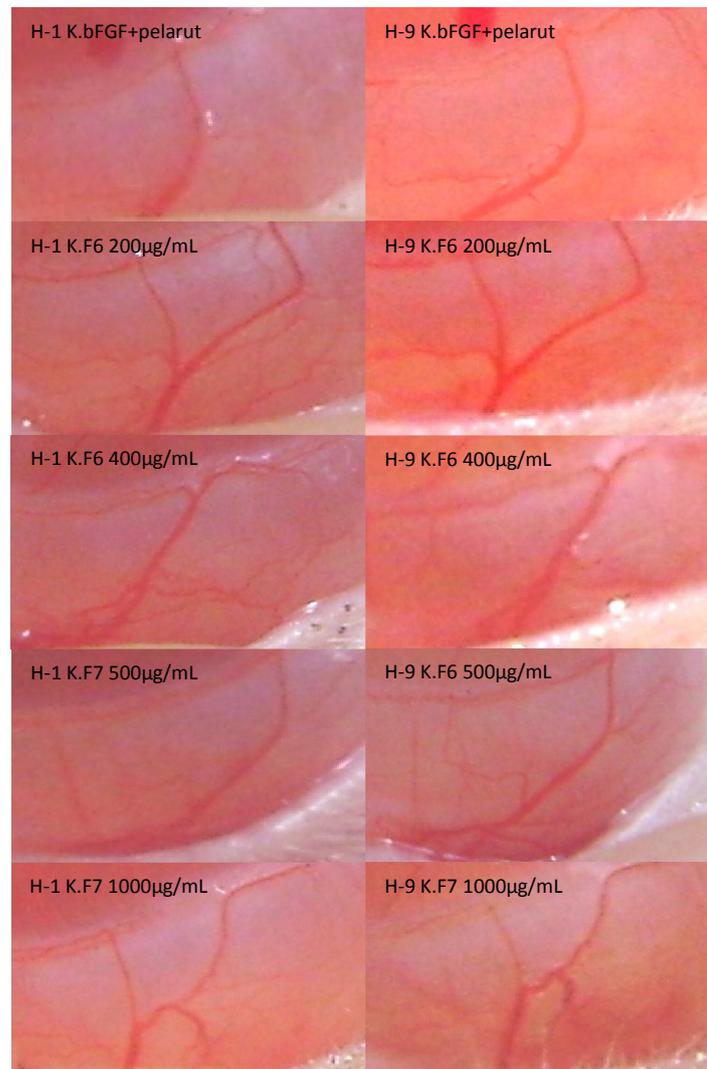
Pada penelitian ini didapat jumlah pembuluh darah pada kontrol bFGF maupun kontrol bFGF+pelarut lebih besar daripada kontrol negatif (Gambar 3). bFGF dapat memacu vaskularisasi pada mata hewan uji dengan bFGF 10ul/hari selama 2 hari terlihat dari adanya pembuluh darah lebih banyak dibanding tanpa bFGF. Pembuluh darah yang muncul akibat peristiwa angiogenesis merupakan percabangan dari pembuluh darah utama berbentuk seperti serabut-serabut halus dan tidak beraturan. Hasil uji daya hambat ekstrak metanolik kayu secang terhadap angiogenesis yang diinduksi bFGF

Hewan uji yang akan digunakan diadaptasikan di kandang terlebih dahulu selama ± 1 minggu untuk mencegah stres pada hewan terhadap lingkungan yang baru. Agar hasil uji antiangiogenesis tidak terpengaruh faktor-faktor yang tidak diharapkan maka kondisi percobaan hewan uji harus disamakan. Hal ini meliputi kondisi kandang, air minum, dan pakan.

Hewan uji berupa tikus dibagi menjadi empat kelompok perlakuan di

mana tiap kelompok dibedakan pemberian fraksi maupun dosisnya. Selain itu, dibuat pula tiga kelompok pembanding yaitu kontrol negatif, kontrol positif, dan kontrol pelarut. Hewan uji pada kelompok kontrol negatif tidak diberi perlakuan apapun, sedangkan pada kelompok kontrol positif diberikan protein bFGF untuk menginduksi angiogenesis. Kelompok kontrol pelarut dibuat untuk mengetahui apakah pelarut yang digunakan (aquades) dapat mempengaruhi aktifitas angiogenesis karena dikhawatirkan pelarut dapat mengiritasi mata hewan uji.

Pada kelompok perlakuan, tikus diberi fraksi ekstrak metanolik kayu secang selama dua hari sebelum penetesan bFGF. Hal ini dilakukan agar pada saat penetesan bFGF dilakukan, ekstrak sudah terdistribusikan ke bagian mata. Harapan dari tindakan ini adalah efek preventif ekstrak metanolik kayu secang terhadap angiogenesis. Pemberian dilanjutkan sampai 6 hari berikutnya. Pemberian bFGF dilakukan selama 2 hari, tepatnya pada hari ketiga dan keempat setelah hari pertama pemberian fraksi metanolik kayu secang. Kemudian pengamatan dilakukan pada hari kesembilan.



Gambar 6. Pengamatan makroskopik respon angiogenesis antara kelompok kontrol bFGF+pelarut dan kelompok perlakuan.

Prosedur pengujian berdasarkan uji antiangiogenesis pada mata tikus yang dilakukan Ermawati (2004). Pada awalnya hewan uji yang digunakan adalah mencit, tetapi kemudian diganti menjadi tikus dengan alasan lebih mudah diamati karena ukuran matanya yang lebih besar.

Pengamatan dilakukan terhadap hasil pemotretan pada bagian sklera mata tikus.

Mata tikus diberi perlakuan seperti yang diuraikan pada metode, kemudian pembuluh darah baru yang terbentuk dikuantifikasi. Data yang

ditampilkan mewakili sampel pada masing-masing kelompok.

Pembentukan pembuluh darah banyak terjadi di tepi sklera, tidak beraturan dan tumbuh berasal dari percabangan pembuluh darah utama. bFGF mampu berikatan dengan reseptor spesifik tirosin kinase dan reseptor heparin sulfate proteoglycon (HSPGs) di permukaan sel. Ikatan ini mampu mendegradasi membran basalis dan matriks ekstra seluler pada pembuluh darah di sklera mata tikus sehingga sel endothelial akan bermigrasi dan berproliferasi membentuk pembuluh darah baru (Ermawati, 2004).

Jumlah pembuluh darah dihitung kemudian dibandingkan dengan kontrol bFGF+pelarut dan dihitung % respon angiogenesis. Pada kelompok perlakuan terjadi efek antiangiogenesis terhadap induksi bFGF. Efek positif ditunjukkan dengan berkurangnya kepadatan pembuluh darah yang terbentuk pada sklera mata tikus dibandingkan kontrol bFGF+pelarut (Gambar 4). Bakal pembuluh darah baru yang terbentuk berhasil dihambat dengan pemberian fraksi ekstrak metanolik kayu secang (Tabel 1). Data menunjukkan respon

antiangiogenesis tidak sebanding dengan kenaikan dosis. Hal ini kemungkinan terjadi penjumlahan saat absorpsi ekstrak. Penjumlahan ini menyebabkan pada dosis yang lebih tinggi efeknya sama dengan dosis yang lebih rendah.

Pembuluh darah baru yang muncul merupakan hasil pemberian bFGF. Pemberian bFGF pada penelitian ini dimaksudkan untuk menginduksi terjadinya angiogenesis, sebagaimana yang terjadi pada keadaan kanker, sehingga pengamatan efek antiangiogenesis ekstrak metanolik kayu secang lebih jelas.

bFGF merupakan salah satu dari berbagai faktor terjadinya angiogenesis seperti *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Brem, 1999). VEGF dan bFGF memegang peranan penting dalam angiogenesis di mana ketika berikatan dengan reseptornya dapat berpengaruh pada regulasi proliferasi, migrasi, dan diferensiasi sel endothelial melalui jalur signal transduksi (Cross and Claesson-Welsh, 2001).

Folkman (1989) mengusung konsep bahwa pertumbuhan tumor dapat dihambat dan dijinakkan ke tahap dorman melalui pemblokiran proses angiogenesisnya. Hasil pengamatannya

di mana tumor primer, berdiameter 1-2 mm, tidak dapat berkembang lebih lanjut dalam kondisi tanpa ditunjang pembuluh darah. Dalam keadaan demikian, tumor hanya mengandalkan "rembesan" nutrisi dan oksigen dari jaringan sekitarnya sehingga tumor dalam kondisi dorman atau tidak aktif. Agen antiangiogenesis berperan penting dalam menghambat pertumbuhan tumor melalui penghambatan pertumbuhan pembuluh darah baru (Morabito, 2006) dan mencegah terjadinya fase metastasis, fase di mana sel kanker mampu melakukan invasi ke dalam jaringan sekitarnya dan seterusnya ke pembuluh darah (Bandaso, 2008). Tahap metastasis ini merupakan tahap paling kritis yang menyebabkan gejala klinis dan bahkan kematian (King, 2000).

Identifikasi kandungan kimia dengan KLT

Identifikasi dilakukan terhadap kandungan senyawa alkaloid dan flavonoid yang diperkirakan ada di dalam fraksi VI dan VII ekstrak metanolik kayu secang. Hal ini berdasarkan atas hubungan sifat kepolaran kedua

golongan senyawa tersebut dengan penyari (metanol) yang sama-sama bersifat semi polar. Senyawa alkaloid dan flavonoid diketahui memiliki aktivitas antikanker. Sudah banyak penelitian yang mengungkap potensi alkaloid, flavonoid, dan terpenoid sebagai antikanker. Flavonoid telah menunjukkan perannya sebagai antioksidan, antimutagenik, antineoplastik dan aktifitas vasodilatator (Miller, 1996). Kandungan flavonoid di dalam daun sambung nyawa terbukti memiliki efek antiangiogenesis pada membran korioalantois telur ayam yang diinduksi bFGF (Jenie *et al.*, 2006). Senyawa alkaloid dalam tumbuhan seperti senyawa vincristine dan vinblastine yang terkandung dalam herba *Catharanthus roseus* L memiliki aktifitas antikanker (dePadua, 1999). Adapun senyawa alkaloid yang lain dari golongan piperidina yang memiliki aktivitas antikanker dengan menginduksi apoptosis (Wittmann *et al.*, 2003).

Tabel 1. Hasil perhitungan pembuluh darah

Kelompok perlakuan	Pembuluh darah teramati pada hari ke-									% respon angiogenesis
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
a. Kontrol (-)	10,5 ± 0,71	10,5 ± 0,71	10,5 ± 0,71	10,5 ± 0,71	10,5 ± 0,71	10,5 ± 0,71	10,5 ± 0,71	10,5 ± 0,71	10,5 ± 0,71	0 ± 0
b. Kontrol (+)	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10,5 ± 0,71	11 ± 1,41	13 ± 1,41	13,5 ± 0,71	13,5 ± 0,71	35 ± 7,07
c. Kontrol bFGF + aquades	10 ± 1,41	10 ± 1,41	10 ± 1,41	10 ± 1,41	10 ± 1,41	11,5 ± 0,71	12 ± 0	13 ± 1,41	13,5 ± 0,71	35,86 ± 12,14
d. Fraksi VI dosis 200µg/mL	10,5 ± 0,71	10,5 ± 0,71	10,5 ± 0,71	10,5 ± 0,71	10,5 ± 0,71	10,5 ± 0,71	11,5 ± 0,71	11,5 ± 0,71	11,5 ± 0	5 ± 7,07
e. Fraksi VI dosis 400µg/mL	11 ± 1,41	11 ± 1,41	11 ± 1,41	11 ± 1,41	11,5 ± 2,12	11,5 ± 2,12	11,5 ± 2,12	11 ± 1,41	11 ± 1,41	0 ± 0
f. Fraksi VII dosis 500µg/mL	9 ± 1,41	9 ± 1,41	9 ± 1,41	9 ± 1,41	9 ± 1,41	10,5 ± 0,71	10,5 ± 0,71	10,5 ± 2,12	9,5 ± 0,71	6,25 ± 8,83
g. Fraksi VII dosis 1000µg/mL	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0	12,5 ± 0,71	13 ± 0	13 ± 0	8,33 ± 0

Identifikasi flavonoid

Fase diam yang digunakan ialah silika gel F_{254} , fase gerak butanol: asam

asetat: aquadest (6: 1: 3). Bercak yang timbul disemprot dengan pereaksi semprot sitroborat.

Tabel 2. Hasil KLT identifikasi Flavonoid

Sampel	hRf	Warna di bawah sinar UV 366 nm	Warna di bawah sinar UV 254 nm	Semprot sitroborat (dibawah sinar UV 366 nm)	Keterangan
a. Fraksi VI	38,56	Kekuningan	Pemadaman	Kuning	Positif flavonoid
	83,25	Kekuningan	Pemadaman	Kuning	Positif flavonoid
b. Fraksi VII	69,54	Kekuningan	Pemadaman	Kuning	Positif flavonoid
	87,32	Kekuningan	Pemadaman	Kuning	Positif flavonoid
c. Rutin	52,29	Ungu Lembayung	Pemadaman	Kuning	Positif flavonoid

Hasil pengamatan KLT di bawah sinar UV 366 nm menunjukkan bercak yang jelas (berfluoresensi) pada fraksi VI, VII dan pembanding rutin. Sedangkan di bawah sinar UV 254 nm menunjukkan adanya pemadaman. Fraksi VI dan VII masing-masing menghasilkan dua bercak pada UV 366 nm yaitu kekuningan (Gambar 5). Hal tersebut menunjukkan bahwa fraksi VI dan VII ekstrak metanolik kayu secang mengandung flavonoid, karena senyawa-senyawa flavonoid berfluoresensi kuning, hijau atau biru pada UV 366 nm. Flavonoid mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi, sehingga menunjukkan pita serapan yang kuat pada spektrum UV (Harborne, 1987). Bercak fraksi VI

dan VII tidak sejajar dengan pembanding rutin (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa yang terkandung di dalam fraksi VI dan VII ekstrak metanolik kayu secang bukan jenis rutin namun masih termasuk dalam golongan senyawa flavonoid.

Untuk menunjukkan bercak pada sinar tampak digunakan pereaksi sitroborat. Pada sinar tampak fraksi, VI, VII dan pembanding rutin memberikan warna kuning di sekitar bercak setelah diberi pereaksi sitroborat. Hal ini karena kemampuan sitroborat untuk membentuk khelat dengan gugus hidroksi (C3 atau C5) yang bertetangga dengan karbonil (C4 keto) pada struktur flavonoid sehingga terjadi warna kuning pada sinar tampak yang menunjukkan

adanya senyawa flavonoid (Januar, 2008). Berdasarkan hasil identifikasi tersebut maka dapat diasumsikan bahwa sampel yang diujikan mengandung flavonoid.

a) Identifikasi alkaloid

Fase diam yang digunakan ialah silika gel F₂₅₄, fase gerak butanol: asam asetat: aquadest (6: 1: 3). Bercak yang timbul disemprot dengan pereaksi semprot dragendorf.

Tabel 3. Hasil KLT identifikasi alkaloid

Sampel	hRf	Warna dibawah sinar UV 366 nm	Warna dibawah sinar UV 254 nm	Semprot dragendorf (dibawah sinar UV 366)	Keterangan
a. Fraksi VI	45,66	Kuning samar	Pemadaman	(-)	Negatif alkaloid
	86,65	Kuning samar	Pemadaman	(-)	Negatif alkaloid
	91,76	Kekuningan	Pemadaman	(-)	Negatif alkaloid
b. Fraksi VII	94,31	Kekuningan	Pemadaman	(-)	Negatif alkaloid

Menurut Harborne (1987) untuk mendeteksi adanya senyawa alkaloid dengan pereaksi dragendorf ditunjukkan dengan warna bercak coklat jingga berlatar belakang kuning. Berdasarkan hasil uji identifikasi alkaloid maka dapat dipastikan sampel yang diujikan negatif alkaloid.

Mekanisme Flavonoid Sebagai antiangiogenesis

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi VI dan VII ekstrak metanolik kayu secang mampu menghambat angiogenesis. Fraksi VI menunjukkan efek antiangiogenesis

yang lebih baik dibanding fraksi VII. Respon angiogenesis untuk fraksi VI dosis 200, 400 µg/mL dan fraksi VII dosis 500, 1000 µg/mL masing-masing secara berurutan adalah sebesar (dalam %) $5 \pm 7,07$; 0 ± 0 ; $6,25 \pm 8,83$; $8,33 \pm 0$.

Dari identifikasi golongan senyawa pada kedua fraksi tersebut menunjukkan bahwa di dalamnya terkandung senyawa golongan flavonoid. Senyawa flavonoid inilah yang diduga berperan dalam kemampuan menghambat angiogenesis dari fraksi ekstrak tersebut. Beberapa penelitian mengenai flavonoid

merekomendasikan kemungkinan aksinya sebagai senyawa kimia yang mampu menghambat kanker dan diantaranya melalui penghambatan angiogenesis (Jenie *et al*, 2006).

Aksi penghambatan angiogenesis dari flavonoid dalam ekstrak metanolik kayu secang diduga melalui beberapa macam mekanisme. Hal ini berdasarkan pada penelitian-penelitian terdahulu mengenai aksi flavonoid dalam menghambat angiogenesis.

Dari penelitian yang dilakukan Igura *et al* (2001) membuktikan bahwa senyawa flavonoid, resveratrol dan quercetin pada kadar 100 μ M mampu menghambat aspek-aspek angiogenesis (proliferasi, migrasi sel endotelial dan pembentukan pipa pembuluh darah). Silymarin, suatu flavonoid antioksidan, sedang dikembangkan sebagai agen inhibitor terhadap enzim COX-2 (Tosetti *et al.*, 2002). Senyawa ini menurunkan jumlah sel HUVEC (sel endothelial) pada kadar 50 μ g/ml. Masferrer *et al.* (2000) melaporkan bahwa angiogenesis diblok oleh inhibitor COX-2 yang diinduksi bFGF. COX-2 berperan pada proses angiogenesis melalui sintesis prostaglandin (PG). Prostaglandin berperan penting di dalam induksi

VEGF. Oleh karena itu penghambatan aktivitas COX-2 akan berakibat pada penghambatan angiogenesis (Masferrer *et al.*, 2000).

Tosetti *et al* (2002) membuktikan bahwa kandungan flavonoid dari teh hijau berefek antiangiogenesis melalui mekanisme penghambatan MMP pada kadar 4mM. Selain itu, kandungan flavonoid dalam ekstrak etanolik daun *G.procumbens* bertindak sebagai inhibitor angiogenesis melalui pengeblokan terhadap reseptor VEGF atau reseptor bFGF sehingga tidak dapat berikatan dengan faktor-faktor pertumbuhan tersebut (Kerbel dan Folkman, 2002) atau menghambat matrix metalloproteinases (MMPs), enzim proteinase yang mengkatalisis rusaknya matriks ekstraselular, sehingga sel-sel endotelial mampu migrasi ke jaringan sekitarnya, membentuk pembuluh darah baru (Keshet dan Ben-Sasson, 1999).

Kesimpulan

Fraksi VI dan VII ekstrak metanolik kayu secang mempunyai aktivitas antiangiogenesis pada mata tikus yang diinduksi oleh bFGF. Fraksi VI dan VII ekstrak metanolik kayu secang mengandung flavonoid.

Daftar Pustaka

- Badami, S., Moorkoth, S., Rai, S. R., Kannan, E., Bhojraj, S., 2003, Antioxidant activity of *Caesalpinia sappan* heartwood, *Biol. Pharm. Bull*, 26(11): 1534-1537.
- DePadua, L.S., N. Bunyapraphatsara and R.H.M.J. Lemmens. 1999. *Plants Resources of South-East Asia*, Bogor, Indonesia.
- Ermawati, Dian. 2004. *Efek Penghambatan Angiogenik Ekstrak Etanol Daun Gynura procumbens (Lour.) Merr. Pada Mata Tikus Rattus norvegicus SD terinduksi b-FGF*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Jenie, R.I., Meiyanto, E., Murwanti, R., 2006. Efek antiangiogenik ekstrak etanolik daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam. *Majalah Farmasi Indonesia* 17(1), 50 – 55, 2006
- Kerbel, R., and Folkman, J., 2002, Clinical Translation of Angiogenesis Inhibitors, *Nat. Rev.*, 2: 727-739.
- Keshet, E., and Ben-Sasson, S. A., 1999, Anticancer drug targets:approaching angiogenesis, *J. Clin.*
- King, R.J.B., 2000, *Cancer Biology*, Ed. 2, Pearson Education, England
- Lee JS, Kim JH, Kim YG. 2007. Anticancer effects of caesalpinia sappan extracts on oral carcinoma and osteosarcoma cells. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2007 Dec;33(6):583-590. Korean.
- Li et al. 2009. *Understanding angiogenesis. The Angiogenesis Foundation*. <http://www.angio.org/understanding/understanding.html>. Diakses pada bulan Februari 2009
- Daly, ME., Andreas Makris, Malcolm Reed, Claire E. Lewis. *Hemostatic Regulators of Tumor Angiogenesis: A Source of Antiangiogenic Agents for Cancer Treatment. Journal of the National cancer Institute*, Vol. 95, No. 22, 1660-1673, November 19, 2003
- Masferrer, J.L, and Leahy K.M, et al, 2000, *Antiangiogenic and Antitumor Activities of Cyclooxygenase-2 Inhibitors*, *Cancer Res*, 60:1306-1311.

- Morabito, A., De Maio, E. et al. *Tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors in clinical trials: current status and future directions*. *Oncologist*. 2006;11:753-764
- Nurulita, N.A., 2005, Efek Sitotoksik dan Anti Proliferasi Ekstrak Metanol Kayu Secang (*Caesalpinea sappan* L.) terhadap sel kanker payudara T47D.
- Ribatti, D., Gulantris, A., Bastaki, M., Vacca, A., Iurlaro, M., Roncali, L., and Presta, M., 1997, New Model for the Study of Angiogenesis and Antiangiogenesis in the Chick Embryo Chorioallantoic Membran: The Gelatin Sponge/Chorioallantoic Membran Assay, *Journal of Vascular Research*, 34:455-463.
- Sasaki, Yohei., Hosokawa, Tomokazu., Nagai, Masahiro., and Nagumo, Seiji. 2006. *In Vitro Study for Inhibition of NO Production about Constituents of Sappan Lignum*. Department of Medicinal Plant Sciences, Hoshi University; 2–4–41 Ebara, Shinagawa, Tokyo 142–8501, Japan.
- Tosetti, F., Ferrari, N., de Flora S., and Albini A., 2002, 'Angioprevention': angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents, *FASEB J.*, 16:2-14.
- Ueda, J., Tezuka, Y., Banskota, A.H., Tran, Q.L., and Tran, Q.k., 2002, Antiproliferative Activity of Vietnamese Medicinal Plants, *Biol. Pharm. Bull.* **25**(6) 753-760.
- Wicaksono, Britanto Dani., Arung, Enos Tangke., dan Sandra, Ferry., 2008, Aktivitas Antikanker dari Kayu Secang, *Cermin Dunia Kedokteran* vol. 35 no. 3/162 , page 133
- Wittmann S, Bali P, Donapaty S, Nimmanapalli R, Guo F, Yamaguchi H, Huang M, Jove R, Wang HG & Bhalla K. 2003. Flavopiridol down-regulates antiapoptotic proteins and sensitizes human breast cancer cells to epothilone B – induced apoptosis. *Cancer Res* 63: 93–99