

**EFEK SUPRESI CURCUMIN  
PADA ORGANOGENESIS DAN MORFOGENESIS  
EMBRIO AYAM UMUR 48 JAM**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**



**Oleh :  
Estiani Kusumaningrum  
NIM : 0910710069**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2012**

**HALAMAN PENGESAHAN**

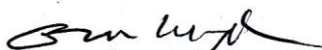
**TUGAS AKHIR**

**EFEK SUPRESI CURCUMIN PADA ORGANOGENESIS DAN MORFOGENESIS EMBRIO AYAM UMUR 48 JAM**

Oleh :  
Estiani Kusumaningrum  
NIM : 0910710069

Telah diuji pada  
Hari : Jumat  
Tanggal : 21 September 2012  
Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I



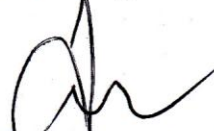
dr. Onggung MH. Napitupulu, M.Kes  
NIP. 19490123 198003 1 001

Pembimbing I



dr. Indriati Dwi Rahayu, M.kes  
NIP.19760519 200501 2001

Pembimbing II



dr. Anik Puryatni, SpA (K)  
NIP. 196312261989032002

Mengetahui,

Ketua Program Studi

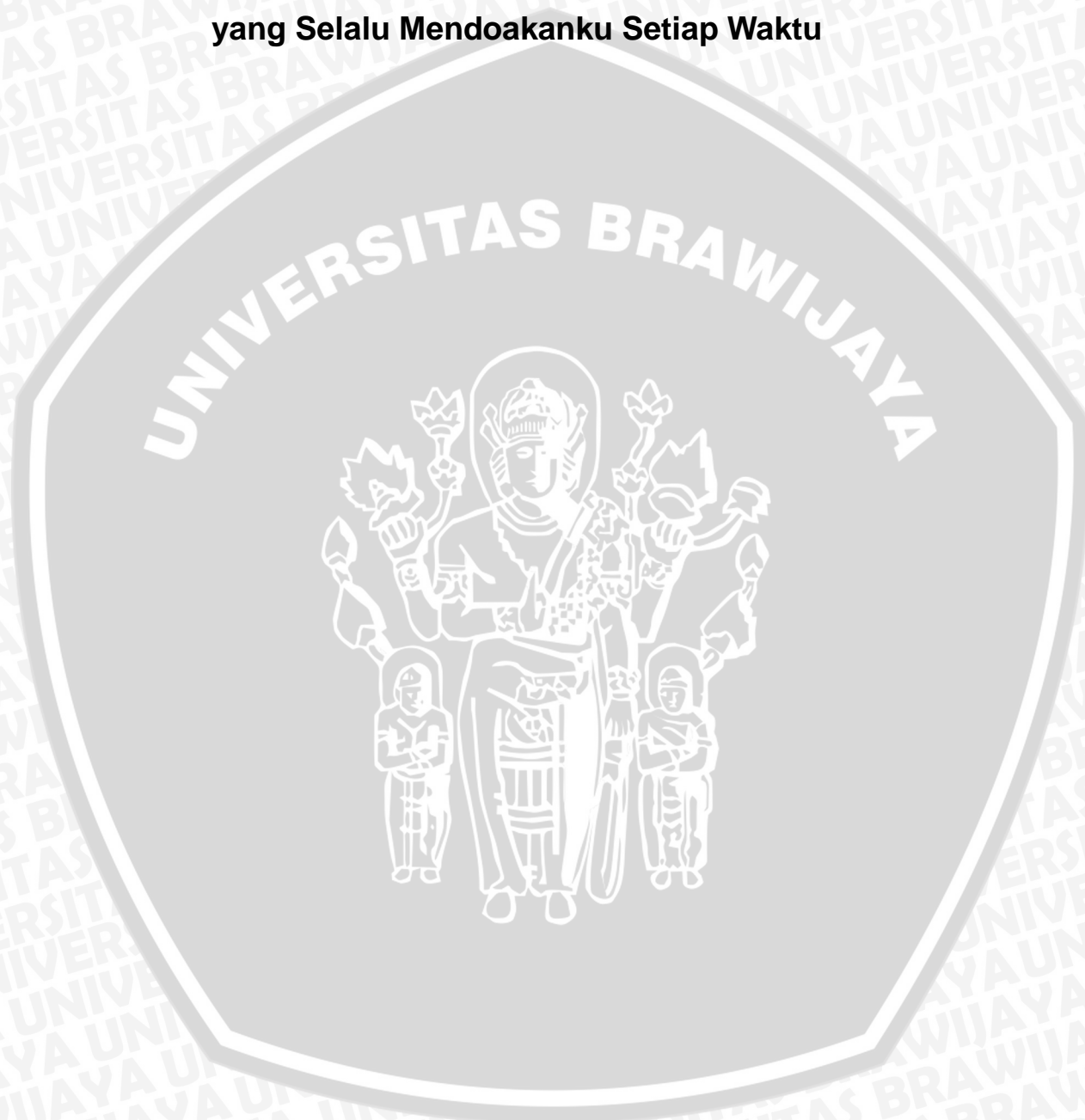


Prof. Dr. dr. Teguh Wani Sardiono, DTM&H, M.Sc, Sp.Par.K.  
NIP.19520410 198002 1 001

**Tugas Akhir Ini Kupersembahkan Untuk**

**“Kedua Orang Tuaku”**

**yang Selalu Mendoakanku Setiap Waktu**



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT, yang telah memberikan berkat, rahmat serta hidayah-Nya kepada penulis dalam menyelesaikan tugas akhir ini yang berjudul “Efek Supresi Curcumin Pada Organogenesis Dan Morfogenesis Embrio Ayam Umur 48 Jam”.

Proses pengerjaan tugas akhir dan penulisannya yang memakan waktu dan tenaga menjadi sebuah pengalaman yang sangat berharga bagi penulis. Kritik dan saran serta dukungan yang datang dari berbagai pihak menjadikan hasil penelitian ini menjadi lebih berkualitas dari segi isi dan lebih bermanfaat bagi penulis karena adanya proses pembelajaran yang terus berlangsung hingga penyelesaian tugas akhir.

Dengan selesainya tugas akhir ini, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberi penulis kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. dr. Indriati Dwi Rahayu, M.Kes sebagai pembimbing pertama yang telah memberikan bimbingan, saran, dan masukan mulai dari proses awal pembuatan proposal, penelitian, hingga tugas akhir ini selesai.
3. dr. Anik Puryatni, M.Kes Sp.A(K) sebagai pembimbing kedua yang telah memberikan bimbingan, saran, dan masukan, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini.
4. dr. Onggung MH. Napitupulu, M.Kes, bersedia menjadi ketua tim penguji Tugas Akhir serta memberikan masukan untuk Tugas Akhir penulis.
5. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB.

6. Kedua orang tua penulis, Bapak Heru Sulistyو dan Ibu Johana, yang selalu mendukung dan mendoakan dalam penyelesaian tugas akhir ini.
7. Kakak perempuan penulis, Tania Kusuma Wardani, yang juga selalu mendukung dan mendoakan dalam penyelesaian tugas akhir ini.
8. Mas Anto sebagai personil Laboratorium anatomi histologi FKUB yang memberikan saran dan membantu pengerjaan tugas akhir hingga memberikan hasil yang lebih baik.
9. Para personil Laboratorium Biomedik FKUB, Mas Yuda , Mas Ali, Mbak Heni dan Mbak Karina yang tidak hanya membantu dalam proses penelitian dan administrasi tetapi juga memberi semangat pada penulis untuk segera menyelesaikan tugas akhir ini.
10. Teman-teman anggota kelompok PKM, Hafis, Rendy dan Randi yang menjadi partner dan teman seperjuangan yang memberi dukungan, serta membagi ilmunya selama proses pembuatan tugas akhir ini.
11. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan tugas akhir ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari sepenuhnya, bahwa dalam penulisan laporan akhir ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis mengharapkan adanya kritik dan saran yang konstruktif dari pembaca, demi kesempurnaan pada penulisan selanjutnya dan dapat bermanfaat untuk bidang kedokteran ke depannya.

Malang 2012

Penulis

**ABSTRAK**

Kusumaningrum, Estiani. 2012. **Efek Supresi Curcumin Pada Organogenesis Dan Morfogenesis Embrio Ayam Umur 48 Jam**. Tugas Akhir. Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) dr. Indriati Dwi Rahayu, M.Kes (2) dr. Anik Puryatni, M.Kes Sp.A(K).

Perkembangan embrio diiringi dengan peningkatan nutrisi, oksigenasi serta pembuangan zat-zat sisa metabolisme sel. Peningkatan kebutuhan tersebut merangsang sel-sel mesenkimal untuk menginduksi sel endotel menjadi jaringan pembuluh darah, proses ini disebut vaskulo-angiogenesis. Sistem vaskuler terbentuk sempurna akan memfasilitasi dan memastikan proses organogenesis dan morfogenesis embrio berjalan tanpa ada gangguan. Gangguan pada proses ini dapat menghambat dan menyebabkan defek kongenital. Curcumin sering digunakan sebagai bahan makanan hingga obat – obatan di berbagai lapisan masyarakat. Walau sudah menjadi konsumsi sehari-hari, penelitian mengenai keamanan curcumin terhadap embrio masih sangat terbatas dan belum bisa menjelaskan pengaruhnya terhadap kondisi fetal. Melalui penelitian ini peneliti mengamati pengaruh curcumin secara *in ovo* pada embrio ayam terutama yang terkait dengan proses vaskulo-angiogenesis yang dapat mempengaruhi proses organogenesis. Konsentrasi curcumin sebagai perlakuan adalah 12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  dan 50  $\mu\text{M}$ . Curcumin diinjeksikan pada telur berusia kurang dari 1 hari dan kemudian telur diinkubasi selama 48 jam. Berdasarkan kriteria skor embrio menurut Drake *et al*, hasil penelitian menunjukkan bahwa curcumin berpengaruh dalam menghambat organogenesis pada embrio ayam dengan hasil uji anova yang bermakna secara statistik ( $p < 0.05$ ). Pada aspek sirkulasi yolk sac, berdasarkan uji Chi-square diketahui hasilnya signifikan ( $p < 0.05$ ). Curcumin juga menunjukkan pengaruhnya dalam retardasi proses flexi cranial, pada perkembangan sistem optikus dan penutupan neuropore anterior berdasarkan umur embrio ayam dengan hasil uji Chi square yang bermakna secara statistik ( $p < 0.05$ ). Kesimpulan dari penelitian ini adalah curcumin menunjukkan pengaruhnya dalam menghambat proses perkembangan vaskulo-angiogenesis dan menyebabkan hambatan pada proses organogenesis embrio yang terfasilitasi oleh proses tersebut.

**Kata Kunci : Embrio, Vaskulogenesis, Organogenesis, Curcumin, In ovo**

**ABSTRACT**

Kusumaningrum, Estiani. 2012. **Suppression effect of Curcumin on Organogenesis and Morphogenesis in 48 hours Chicken Embryo.** Final Assignment, Medical program, Medical Faculty, Brawijaya University. Supervisors : (1)dr. Indriati Dwi Rahayu, M.Kes., (2) dr. Anik Puryatni, M.Kes Sp.A(K).

Embryonic development is accompanied by increase need of nutrition, oxygen and residual cell metabolism disposal. These conditions stimulate mesenchymal to induce endothelial cell to form vascular network, this process called vasculo-angiogenesis. Perfect vascular network will facilitate and ensure organogenesis and morphogenesis of embryo running without any defect. Defect on this stage of development will inhibit and causing congenital defect. Curcumin which commonly used as preservation of food and medicine, has been used by many people on the world. Despite curcumin has been consumed daily, research about curcumin safety on embryo are still limited and can not explain curcumin negative effect on fetal condition. This study is focus to investigate curcumin effect on chicken embryo with in ovo method, which mainly related on vascular network defect that can affect organogenesis. Curcumin concentration used on this research were 12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  and 50  $\mu\text{M}$ . Curcumin solution injected to chicken egg that aged less than a day and then egg would incubate for 48 hours. Based on Drake et al embryo scoring criteria, this study resulted show curcumin affect in chicken embryo organogenesis with one way anova analysis outcome showed this result is significant ( $p < 0.05$ ). On yolk sac circulation, based on chi square test outcome showed this result is significant ( $p < 0.05$ ). Curcumin also affected growth retardation of flexi cranial, development of optical system and closing of neuropore anterior with statistical analysis by Chi Square test outcome showed this retardation development is significant ( $p < 0.05$ ). Conclusion on this research are curcumin show have effect to inhibited vascular network development and can defect on embryo organogenesis that facilitated by that process.

**Key words : Embryo, Vaskulogenesis, Organogenesis, Curcumin, In ovo**

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	I
HALAMAN PENGESAHAN .....	II
HALAMAN PERUNTUKAN.....	III
KATA PENGANTAR.....	IV
ABSTRAK.....	VI
ABSTRACT.....	VII
DAFTAR ISI .....	VIII
DAFTAR GAMBAR .....	XII
DAFTAR TABEL .....	XIII
DAFTAR LAMPIRAN .....	XIV
DAFTAR SINGKATAN .....	XV
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
1.4.1 <u>Manfaat Akademik</u> .....	4
1.4.2 <u>Manfaat Praktis</u> .....	5
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Sistem Vaskularisasi Awal Pertumbuhan Embrio.....	6
2.1.1 <u>Kondisi Sebelum Tahap Vaskulogenesis</u> .....	6
2.1.2 <u>Vaskulogenesis</u> .....	7



2.1.2.1 <u>Vaskulogenesis Ekstraembrionik</u> .....	7
2.1.2.2 <u>Vaskulogenesis Intraembrionik</u> .....	8
2.1.3 <u>Angiogenesis</u> .....	9
2.2 Peran Molekular Pada tahap Vaskuloangiogenesis .....	10
2.2.1 <u>Regulasi Positif Proses Vaskuloangiogenesis</u> .....	11
2.2.1.1 <u>Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)</u> .....	12
2.2.1.2 <u>Fibroblast Growth Factor (FGF)</u> .....	12
2.2.1.3 <u>Transcription Growth Factor-<math>\beta</math> (TGF-<math>\beta</math>)</u> .....	12
2.2.2 <u>Regulasi Negatif Proses Vaskuloangiogenesis</u> .....	13
2.3 Klasifikasi Perkembangan Embrio .....	13
2.3.1 <u>Proses Embriogenesis Sebelum Vaskuloangiogenesis</u> .....	15
2.3.2 <u>Proses Organogenesis Pada Embrio Hingga Minggu Ke-4</u> ....	16
2.3.2.1 <u>Stage 9 (Embrio Manusia Umur 20-22 Hari; 1-4 So mit; Embrio Ayam Umur 24 – 36 Jam</u> .....	16
2.3.2.2 <u>Stage 10 (Embrio Manusia Umur 22-24 Hari; 4-12 So mit; Embrio Ayam Umur 36-48 Jam)</u> .....	16
2.3.2.3 <u>Stage 11 (Embrio Manusia Umur 24-48 Hari; 12-20 So mit; Embrio Ayam Umur 48-54 Jam</u> .....	17
2.4 Curcumin .....	18
2.5 Farmakokinetik dan Farmakodinamik Curcumin .....	18
2.6 Peran Curcumin Dalam Menghambat Proses Angiogenesis .....	19
2.7 Efek Curcumin Pada Embrio.....	20
<b>BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>	
3.1 Kerangka Teori.....	22
3.2 Hipotesa .....	24

## BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian.....	25
4.2 Populasi dan Sampel .....	25
4.2.1 <u>Populasi</u> .....	25
4.2.2 <u>Sampel</u> .....	26
4.3 Variabel Penelitian .....	26
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	26
4.5 Instrumen Penelitian.....	27
4.6 Definisi Operasional.....	28
4.7 Prosedur Penelitian .....	29
4.7.1 <u>Alur Penelitian</u> .....	29
4.7.2 <u>Pembagian Kelompok</u> .....	30
4.7.3 <u>Pra-Perlakuan</u> .....	30
4.7.4 <u>Perlakuan</u> .....	30
4.7.5 <u>Perlakuan Dengan Curcumin</u> .....	30
4.7.6 <u>Inkubasi</u> .....	31
4.7.7 <u>Pengambilan Bahan Coba</u> .....	31
4.7.8 <u>Pengambilan Gambar</u> .....	31
4.7.9 <u>Penyimpanan Bahan Coba</u> .....	31
4.7.10 <u>Pengecatan Imunohistokimia</u> .....	32
4.7.11 <u>Pengamatan Mikroskop</u> .....	32
4.7.12 <u>Pengamatan Morfologis Embrio</u> .....	33
4.8 Analisa Data .....	33

## BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

5.1 Sirkulasi <i>Yolk Sac</i> .....	34
-------------------------------------	----

5.2 Flexi Cranial.....	35
5.3 Neuropore Anterior .....	36
5.4 Sistem Optikus .....	37
5.5 Skor Total Embrio .....	38

## **BAB VI PEMBAHASAN**

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian .....	39
6.1.1 <u>Pengaruh Pemberian Curcumin Terhadap Sirkulasi <i>Yolk Sac</i></u> .....	40
6.1.2 <u>Pengaruh Pemberian Curcumin Terhadap Adanya Flexi Cranial dan Pengaruhnya Pada Organogenesis Jantung</u> .....	44
6.1.3 <u>Pengaruh Pemberian Curcumin Terhadap Tertutupnya Neuropore Anterior</u> .....	46
6.1.4 <u>Pengaruh Pemberian Curcumin Terhadap Keberadaan Sistem Optikus</u> .....	49
6.1.5 <u>Pengaruh Pemberian Curcumin Terhadap Skor total embrio</u> .....	51
6.2 Implikasi Terhadap Bidang Kedokteran.....	52
6.3 Keterbatasan Penelitian.....	53

## **BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN**

7.1 Kesimpulan.....	56
7.2 Saran .....	56
<b>Daftar Pustaka</b> .....	<b>57</b>
<b>Lampiran</b> .....	<b>65</b>
<b>Pernyataan Keaslian Tulisan</b> .....	<b>74</b>

**DAFTAR GAMBAR**

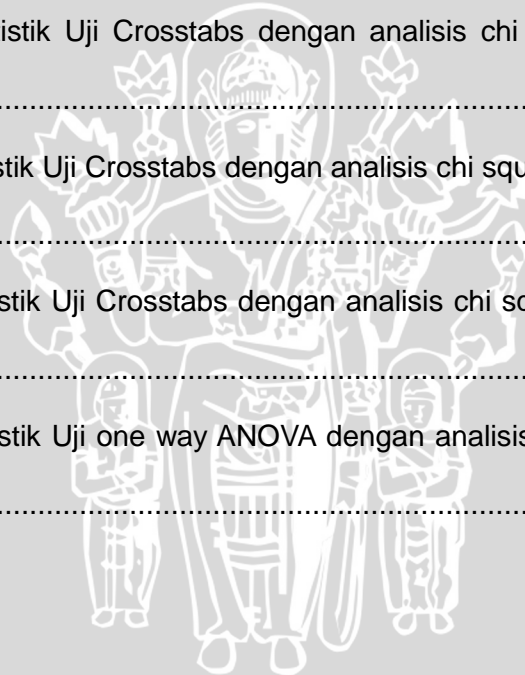
	Halaman
Gambar 2.1 Skema Vaskulogenesis Ekstraembrionik .....	8
Gambar 2.2 Hipotesis Keseimbangan Faktor Angiogenik .....	11
Gambar 4.1 Bagan Alur Penelitian .....	29
Gambar 5.1 Hasil Pengamatan Sirkulasi <i>Yolk Sac</i> pada Embrio Ayam Umur 48 Jam .....	35
Gambar 5.2 Flexi Cranial pada Embrio Ayam Umur 48 Jam .....	36
Gambar 5.3 Hasil Pengamatan Flexi Cranial pada Embrio Ayam Umur 48 Jam .....	36
Gambar 5.4 Hasil Pengamatan Tertutupnya Neuropore Anterior pada Embrio Ayam Umur 48 Jam .....	37
Gambar 5.5 Hasil Pengamatan Keberadaan Sistem Optikus pada Embrio Ayam Umur 48 Jam .....	38

DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 2.1	Data Perbandingan Umur Embrio (Species/Days) .....	14
Tabel 2.2	Perkembangan Organ Internal .....	15
Tabel 4.1	Skor Embrio .....	33
Tabel 5.1	Hasil Pengamatan Sirkulasi <i>Yolk Sac</i> pada Embrio Ayam Umur 48 Jam dengan Paparan Curcumin .....	34
Tabel 5.2	Hasil Pengamatan Flexi Cranial pada Embrio Ayam Umur 48 Jam dengan Paparan Curcumin .....	35
Tabel 5.3	Hasil Pengamatan Neuropore Anterior pada Embrio Ayam Umur 48 Jam dengan Paparan Curcumin .....	36
Tabel 5.4	Hasil Pengamatan keberadaan Sistem Optikus pada Embrio Ayam Umur 48 Jam dengan Paparan Curcumin .....	37
Tabel 5.5	Hasil Perhitungan Jumlah Skor Total pada Embrio Ayam Umur 48 Jam dengan Paparan Curcumin .....	38

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Alat dan Bahan Penelitian .....	65
Lampiran 2 Dokumentasi Kegiatan .....	66
Lampiran 3 Data Statistik Uji Crosstabs dengan analisis chi square pada Sirkulasi Yolk Sac .....	68
Lampiran 4 Data Statistik Uji Crosstabs dengan analisis chi square pada flexi cranial.....	69
Lampiran 5 Data Statistik Uji Crosstabs dengan analisis chi square pada Neuropore Anterior .....	70
Lampiran 6 Data Statistik Uji Crosstabs dengan analisis chi square pada Sistem Optikus .....	71
Lampiran 7 Data Statistik Uji one way ANOVA dengan analisis chi square pada Skor Total Embrio .....	72



## DAFTAR SINGKATAN

Ang	: Angiopoietin
BMP	: Bone Morphogenic Protein
ECM	: Ekstracellular Matrix
DMSO	: Dimethylsulfoxide
FGF	: Fibroblast growth Factor
HIF	: Hypoxia Inducible Factor
HUVEC	: Human Umbilical Vein Endhotelial Cell
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: hidrogen peroksida
MG	: Methylglyoxal
MMP	: Matriks Metalloproteinase
NaCl	: Natrium clorida
NF-κB	: Nuclear factor Kappa-B
PDGF	: Platelet- Derived Growth Factor
TGF-β	: Transcription Growth Factor
TIE	: Tyrosine Kinase
TNF	: Tumor necrosis factor
VEGF	: Vascular Endhotelial Growth factor
VEGFR	: Vascular endhotelial Growth Factor Receptor
VSMC	: Vascular Smooth Muscle Cells

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang Masalah

Pertumbuhan fetus dalam proses kehamilan dipengaruhi oleh berbagai faktor dalam mekanisme sistem tubuh. Bila regulasi tubuh tidak berlangsung dengan baik maka akan mengakibatkan kondisi kehamilan yang tidak diinginkan yang bisa berakibat pada abnormalitas dari pertumbuhan fetus hingga menimbulkan kematian pada fetus (Chaiworapongsa *et al*, 2011). Berdasarkan data epidemiologi tahun 2006 di negara USA, dari 10 penyebab tertinggi kematian bayi, Penyebab nomor satu adalah *congenital anomaly*. *Congenital anomaly* merupakan kelainan yang terjadi akibat gangguan proses pertumbuhan dan perkembangan embrio. (Heron *et al*, 2006).

Pada kehidupan fetus intrauteri, pertukaran zat terjadi melalui proses difusi. Sejalan dengan perkembangannya, mudigah tidak lagi dapat mencukupi akan zat makanan hanya melalui difusi saja. Pada tingkat ini, sel - sel lapisan mesoderm splanknik pada mudigah presomit lanjut diinduksi oleh endoderm di bagian bawahnya untuk membentuk angioblas dan menandai awal mulanya vaskulogenesis (Sadler TW, 1995; Ferguson *et al.*, 2005). Perlu diketahui bahwa organ yang pertama kali mulai berkembang adalah jantung. sel – sel angiogenik sudah mulai muncul pada tahap presomit dari embrio yaitu hari 17 – 18. saat awal mulanya proses vaskulogenesis. Proses ini akan menginisiasi dan memfasilitasi perkembangan organ internal lainnya seperti otak, liver, ginjal, usus dan lainnya yang terjadi pada minggu ketiga kehamilan. (Bie, 2001). Vaskulogenesis diawali dengan pembentukan angioblas sebagai sel endothelial



progenitor yang akan bermigrasi dan menyusun sistem vaskular secara de novo. Proses vaskulogenesis ini ditandai dengan pembentukan pembuluh primitif dari sel - sel endotel (Wang and Zhao, 2010).

Proses angiogenesis, yang dikenal juga dengan istilah neovaskularisasi ditandai dengan lanjutan pertumbuhan pembuluh darah baik *sprouting* maupun *remodelling*. Proses ini ditandai dengan proliferasi sel - sel endotel menuju jaringan yang akan merangsang stimulus faktor pertumbuhan (Oklu *et al*, 2010). Tujuan utama dari proses ini, setiap sel yang didukung oleh kinerja sistem vaskular dapat memperoleh nutrisi dan oksigen sesuai kebutuhan dan mengantarkan hasil produksi sel seperti hormon, zat sisa, dan bahan vasoaktif lainnya (Papetti and Herman, 2002). Proses vaskulo angiogenesis yang kompleks ini membutuhkan keseimbangan antara faktor positif dan negatif dari proses angiogenesis. Bila terjadi peningkatan faktor anti angiogenik maka dapat memicu apoptosis sel sehingga proses distribusi udara dan nutrisi menuju sel sel akan terhambat dan bisa mengakibatkan terganggunya proses embriogenesis (Romero, 2010; Edwards, 2011).

Salah satu zat anti angiogenik terkandung di dalam *Curcuma longa* adalah curcumin. *Curcuma longa* mengandung sekitar 2 - 5 % curcumin. Saat ini sudah banyak dilakukan penelitian mengenai efek curcumin yang memiliki efek terapi. Dalam berbagai penelitian menunjukkan bahwa curcumin berperan sebagai anti inflamasi, antioksidan (Kunchandy, 1990) anti karsinogenik (Huang *et al.*, 1994; Babu and Srinivasan, 1997), hipolipidemia dan anti diabetes (Arun and Nalini, 2002). Hasil penelitian menunjukkan bahwa efek anti kanker dari curcumin disebabkan oleh salah satu sifatnya sebagai zat anti angiogenik (Li *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007; Oyagbemi *et al.*, 2010).

Penelitian mengenai pengaruh curcumin terhadap embrio masih sangat terbatas dan belum bisa merepresentasikan kondisi perkembangan fetal. Penelitian yang dilakukan pada tahun 1980 menunjukkan bahwa curcumin tidak meningkatkan tingkat kelainan pada kandungan, bayi yang dilahirkan dan infertilitas pada hewan coba tikus (Vijayalaxmi, 1980). Dalam hasil penelitian lainnya menunjukkan bahwa curcumin menghambat proliferasi sel endotel manusia secara *in vitro* dan menonaktifkan respons dari *FGF (Fibroblast Growth Factor)* secara *in vivo*. (Liu *et al.*, 2008) Pada penelitian yang dilakukan di tahun 2003 dan tahun 2010 menggunakan hewan coba zebrafish dan tikus menunjukkan apoptosis sel pada hewan tersebut (Chen *et al.*, 2010; Shiau *et al.*, 2011). Sejauh ini dari penelitian tersebut, curcumin tidak dapat dibuktikan keamanannya atau pengaruh pastinya terhadap embriogenesis.

Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh curcumin pada embrio secara *in ovo* terutama terkait dengan proses vaskulogenesi dan pengaruhnya terhadap organogenesi dan morfogenesi embrio ayam. Embrio ayam diberi perlakuan dan diinkubasi selama 48 jam sebanding dengan umur kehamilan manusia 24 hari saat sistem vasular sudah terbentuk dan jantung mulai memompa darah sebagai tanda awal berfungsinya sistem kardiovaskular pada tahap organogenesi (O’Rahilly, 1979; O’Rahilly and Muller, 1987). Penggunaan embrio ayam dalam penelitian ini didukung oleh berbagai faktor dari penelitian sebelumnya. Dari segi harga, embrio ayam lebih murah dibandingkan dengan hewan coba lainnya. Hasil menunjukkan bahwa embrio ayam baik digunakan sebagai model pembelajaran perkembangan hematopoiesis. Ini didukung dari berbagai model pembelajaran, embrio ayam dapat menjelaskan informasi baik secara molekuler maupun genomik mengenai

perkembangan *hematopietic* dan morfogenesis serta abnormalitasnya ( Drake *et al.*, 2006; Sheng, 2010 ).

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah curcumin dapat mempengaruhi proses tumbuh kembang pada model coba embrio ayam?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Umum:

Mengetahui pengaruh pemberian curcumin terhadap proses organogenesis dan morfogenesis embrio ayam.

Khusus:

1. Mengetahui pengaruh pemberian curcumin terhadap sirkulasi *yolk sac* embrio ayam umur 48 jam.
2. Mengetahui pengaruh pemberian curcumin terhadap flexi cranial pada embrio ayam umur 48 jam.
3. Mengetahui pengaruh pemberian curcumin terhadap penutupan neuropore anterior pada embrio ayam umur 48 jam.
4. Mengetahui pengaruh pemberian curcumin terhadap perkembangan sistem optikus pada embrio ayam umur 48 jam.

## 1.4 Manfaat Penelitian

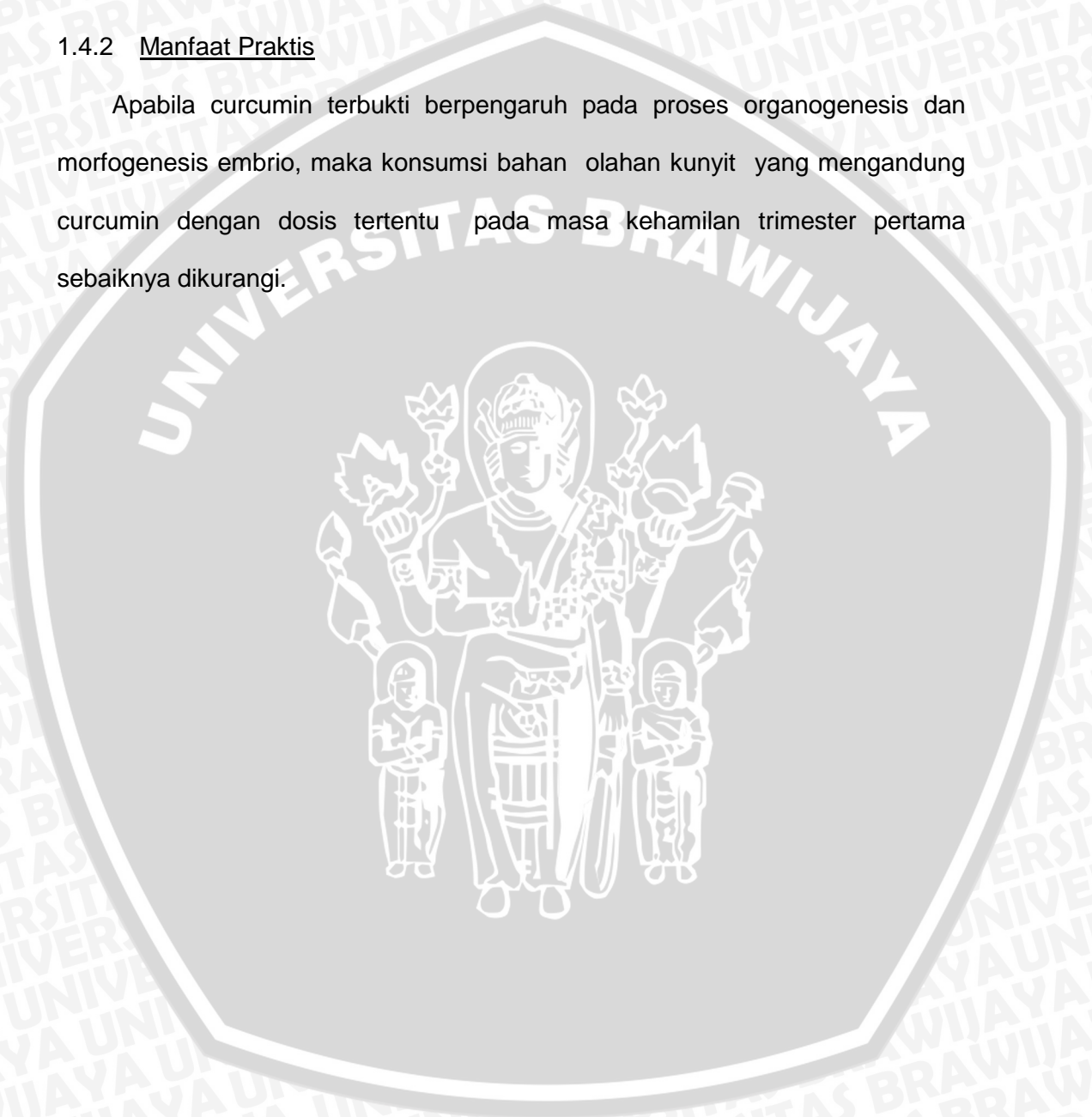
### 1.4.1 Manfaat Akademik

1. Menjadi landasan penelitian selanjutnya untuk mempelajari pengaruh keamanan curcumin terhadap proses organogenesis dan morfogenesis pada embrio.

2. Menjadi dasar dilakukan uji keamanan konsumsi bahan-bahan olahan kunyit yang mengandung curcumin pada ibu hamil di trimester pertama kehamilan

#### 1.4.2 Manfaat Praktis

Apabila curcumin terbukti berpengaruh pada proses organogenesis dan morfogenesis embrio, maka konsumsi bahan olahan kunyit yang mengandung curcumin dengan dosis tertentu pada masa kehamilan trimester pertama sebaiknya dikurangi.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Sistem Vaskularisasi awal Pertumbuhan Embrio

##### 2.1.1 Kondisi Sebelum Tahap Vaskulogenesis

Dalam teorinya, Perkembangan vaskular sebagian besar ditentukan oleh program genetik. Namun, dalam penelitian membuktikan bahwa faktor non genetik berperan dalam memodulasi perkembangan vaskular, proses remodelling dari pleksus kapiler hingga membentuk arteri dan vena. Tahapan penting dimulainya proses vaskulogenesis adalah kondisi hypoxia yang menstimulasi proses ini. Pada proses perkembangan embrio, distribusi O<sub>2</sub>, nutrisi dan faktor pertumbuhan lainnya diawali dari proses difusi. Sejalan dengan perkembangan embrio, diperlukan mediator yang lebih kompleks dalam memenuhi kebutuhan setiap sel embrio (Abbas, 2003). Keadaan ini memicu kondisi hypoxia yang mengakibatkan tersekresinya *Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$*  (*HIF-1 $\alpha$* ), yang berasal dari kompleks faktor transkripsi heterodinamik, yaitu ekspresi dari *HIF-1 $\beta$* . Sel -sel pembuluh darah baru yaitu hemangioblas merespons keadaan *hypoxia*. *HIF-1* juga menginduksi faktor molekuler yang berperan dalam perkembangan vaskuler seperti *VEGFs* dan reseptornya. Sel -sel angioblas pada lapisan mesoderm bermigrasi dan mulai bergabung membentuk pulau - pulau kecil yang dikenal dengan istilah *blood island* (Patel-Hett and D'Amore, 2011).

### 2.1.2 Vaskulogenesis

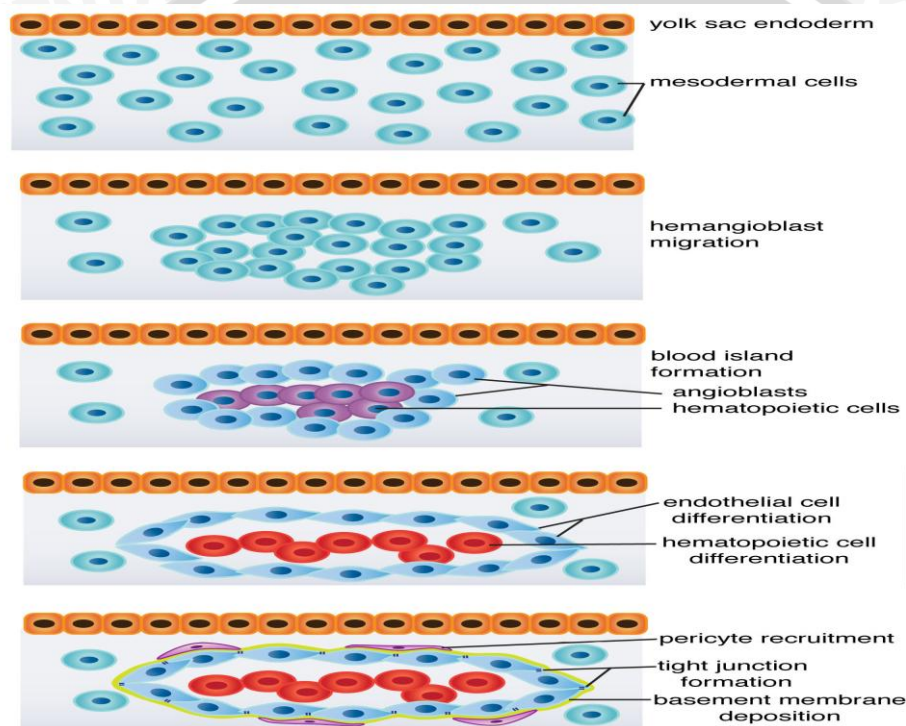
Vaskulogenesis merupakan proses diferensiasi secara in situ dan pertumbuhan pembuluh darah dari jaringan mesodermal berasal dari sel – sel hemangioblas. Proses ini dimulai dari daerah splanchnopleural terdiri dari endoderm dan splanchnopleural mesoderm (Karoline, 2008). Proses pembentukan pembuluh darah baru secara de novo dari sel - sel prekursor endothelial yang disebut angioblas, melalui proses diferensiasi. Tahap selanjutnya setelah diferensiasi sel adalah proliferasi sel angioblas dan menggabungkan diri menjadi jaringan dasar pembuluh darah yang disebut dengan pleksus kapiler primer, yang akan merangsang terbentuknya awal pembuluh darah. Proses vaskulogenesis terdiri dari tiga tahapan. ( Hiratsuka *et al.*, 2005 )

Pertama diawali dari *haemangiogenic stem-cell* yang menginduksi diferensiasi sitotrofoblas melalui regulasi dari *VEGF* ( *Vascular Endothelial Growth Factor* ). Tahap kedua ditandai dengan proses pembentukan prevaskular dan proliferasi didukung oleh faktor pertumbuhan yang diproduksi oleh sel sitotrofoblas dan sel hofbauer. Tahap ketiga adalah proses remodelling, yaitu diferensiasi oleh sel perivaskular dan juga induksi *FGF* dan *VEGF* dalam meneruskan proses transisi dari vaskulogenesis dan angiogenesis yang ditandai dengan terbentuknya pleksus vaskular ( Wang and Zhao, 2010).

#### 2.1.2.1 Vaskulogenesis Ekstraembrionik

Proses ini pertama kali terbentuk dari *blood island* yang membentuk formasi di *yolk sac*. Sel – sel angioblas berproliferasi, migrasi dan berhubungan satu sama lain untuk membentuk pembuluh darah primitif. Perkembangan pembuluh darah pada tahap ini terjadi diferensiasi angioblas menjadi sel – sel

endotel yang nantinya akan membentuk lumen dari vaskular dan deposit pada membran dasar. Pada lokasi *yolk sac* sendiri, vaskulogenesis yang terjadi menghasilkan pleksus vaskular primitif. *Blood island* yang merupakan kumpulan sel-sel hemangioblas berdiferensiasi secara *in situ* membentuk lapisan luar dari angioblas dan prekursor hematopoietik yang berasal dari *inner mass*.



Gambar 2.1 Skema Vaskulogenesis Ekstraembrionik (Patel-Hett and D'Amore, 2011).

### 2.1.2.2 Vaskulogenesis Intraembrionik

Vaskulogenesis intraembrionik diinisiasi dari pembentukan kapiler pada mesenkim cranial dan endokardium. Pembuluh darah berkembang dan membentuk *para aortic mesoderm*, Endokardium, aorta dorsalis dan ventralis, vena cardinal dengan tujuan pembentukan alantois (Patel-Hett and D'Amore, 2011).

### 2.1.3 Angiogenesis

Angiogenesis merupakan tahapan pembentukan pembuluh darah baru melalui proses sprouting dari pembuluh darah sebelumnya. Proses ini terjadi dimulai pada jaringan somatopleural yang terdiri dari ektoderm dan mesoderm Somatopleural. Setelah pembentukan pleksus kapiler, Pembuluh darah mengalami proses remodelling dengan pemanjangan pembuluh darah petama kalinya dan pembentukan cabang cabang pembuluh darah baru dari cabang utama. Tahap angiogenesis yang normal kebanyakan terjadi pada tahap embrio, yang mendukung pembentukan pembuluh darah untuk vaskularisasi pada tahap perkembangan embrio. Angiogenesis juga terjadi saat dewasa pada siklus ovarium, penyembuhan luka dsb. (Oklu *et al*, 2010).

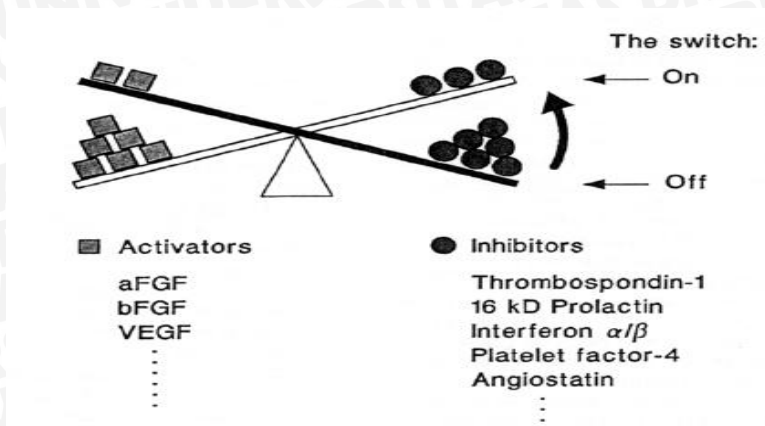
Proses remodeling dari pembuluh darah baru membutuhkan koordinasi dari beberapa mekanisme yang terjadi pada mikrovaskular. Ketika proses pemanjangan terjadi, sel sel perisit dihilangkan dari percabangan pembuluh darah oleh angiopoietin-2 (Ang-2). Kemudian terjadi proses degradasi dan remodeling dari membran dasar sel endotel dan matriks ekstraseluler oleh enzim protease seperti *Matriks Metalo Proteinase (MMP)* dan terbentuk pula matriks baru yang disintesis dari sel sel stromal. Matriks baru ini bergabung bersama faktor pertumbuhan seperti *FGF*, *VEGF* untuk memperkuat proses migrasi dan proliferasi sel endotel. proses pembelahan sel sel endotel terus terjadi sampai membentuk struktur seperti pipa. Pada tahap ini, sel otot polos, sel perisit dan sel mesenkim mulai menempati permukaan abluminal dari endotel dilanjutkan dengan aliran darah pada pembuluh darah baru tersebut (Gavard *et al*, 2006).



## 2.2 Peran Molekuler pada Tahap Vaskuloangiogenesis

Berbagai jalur molekuler berperan dalam diferensiasi dan spesifikasi sel prekursor endothelial seperti famili *Transcription Growth Factor- $\beta$*  (*TGF- $\beta$* ) khususnya *Bone Morphogenic Protein (BMP)* dan faktor pertumbuhan lainnya seperti *fibroblast growth factor (FGF)*, *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)* faktor lainnya. Jalur molekuler yang paling berperan adalah *VEGF*. Peran molekuler sangat penting baik sebagai regulator positif maupun negatif. Dalam studi genetik, Hasil menunjukkan bahwa *VEGF* dan reseptornya yaitu *VEGFR1*, *VEGFR2* dan *VEGFR3* berperan utama pada tahap vaskulogenesis. Pada penelitiannya, embrio tikus yang kekurangan *VEGFR-2* mengalami kematian di awal proses perkembangannya, tepatnya di awal proses vaskulogenesis dan hematopoiesis (Pudliszewski and Pardanaud, 2005).

Pertumbuhan dan perkembangan vaskular yang terhambat akan berakibat pada abnormalitas pembentukan *blood island* dan migrasi sel endotel. Adapun dalam penelitian menunjukkan bahwa *VEGFR-1* juga berperan sebagai regulator positif dalam proses migrasi dan regulasi permeabilitas vaskular. Peran negatifnya adalah menghambat ikatan antara *VEGF* dan *VEGFR- 2*. Apabila kerja Negatif dari *VEGFR-1* ini berlebihan maka akan menimbulkan abnormalitas pada proses vaskulo angiogenesis. Ikatan antara *VEGF* dan *VEGFR2* berefek di segala aspek dalam proses normal maupun patologis dari pembentukan pembuluh darah (Papetti and Herman, 2001; Olsson *et al*, 2006).



Gambar 2.2 Hipotesis Keseimbangan faktor angiogenik ( Yeo, 2000 ).

### 2.2.1. Regulasi Positif Proses Vaskuloangiogenesis

Pada proses angiogenesis yang normal, proses regulasi yang kuat mendukung proses proliferasi sel membentuk jaringan pembuluh darah. Proses ini tidak lepas dari berbagai faktor pertumbuhan polipeptida, interaksi antar matriks, ikatan antar molekul dan efek hemodinamik sebagai regulator positif dan negatif yang mempengaruhi proses normal dari angiogenesis. Regulator positif dari proses ini khususnya didukung oleh berbagai peran molekuler. Berbagai faktor pertumbuhan yang turut berperan pada tahap vaskulogenesis di antaranya *VEGF*, *FGF*, hedgehog family, TIE-2, neuropilin, *TGF-β* dan masih banyak lagi faktor lainnya (Olsson *et al*, 2006).

Pada tahap angiogenesis, terdapat faktor pro angiogenik yang mendukung jalannya proses ini seperti *bFGF*, *VEGF*, *TGF-β* PDGF dan angiotensin - 1 dan beberapa faktor pertumbuhan lainnya. *BFGF* dan *VEGF* berperan pada fase proliferasi dan maturasi sel endotel. (Dvorak and Hampl, 2005). *TGF-β* berperan dalam menstabilkan jaringan kapiler yang sudah matang dengan memperkuat struktur *Ekstracellular Matrix (ECM)* dan spesifikasi sel endotel. Sedangkan PDGF berperan dalam menerima sel - sel perisit untuk mengatur fleksibilitas kapiler (Karoline, 2008).

#### 2.2.1.1. *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)*

*VEGF* merupakan regulator yang paling penting dalam perkembangan pembuluh darah pada proses embriogenesis dan juga membantu pembentukan pembuluh darah pada manusia dewasa. *VEGF* bekerja terutama pada sel – sel endotel yang diproduksi oleh berbagai jenis sel termasuk *Vascular Smooth Muscle Cells (VSMC)* dan Fibroblas. Selain berperan dalam proses perkembangan vaskular, Efek *VEGF* juga banyak diteliti dan memiliki banyak peranan sebagai neuroprotektif, mendukung perkembangan paru – paru, pertumbuhan tulang, homeostasis ginjal dan sistem reproduksi serta hematopoiesis. (Takahashi and Shibuya, 2005; Dulak, 2010). *VEGF*, faktor pertumbuhan utama yang mendukung proses vaskulogenesis, berperan pada tahap migrasi sel angioblas dari mesoderm dan diferensiasi menjadi sel endotel (Olsson *et al*, 2006). Selain itu *VEGF* juga berperan dalam proliferasi sel – sel endotel pada proses angiogenesis.

#### 2.2.1.2. *Fibroblast Growth Factor (FGF)*

*FGF* juga faktor molekular yang berperan pada awal perkembangan pembuluh darah. Pada mamalia, *FGF* dan famili terdiri dari 18 Faktor endokrin peptida. *FGF-2* merupakan kelompok *FGF* yang paling berperan dalam menginduksi sel – sel angioblas dari mesoderm (Cox and Poole, 2000). *FGF* berperan dalam proliferasi, dan proses sprouting dari vaskular pada tahap angiogenesis (Karoline, 2008).

#### 2.2.1.3. *Transcription Growth Factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )*

*TGF- $\beta$*  dan famili seperti *TGF- $\beta$*  (*TGF- $\beta$ 1*, *TGF- $\beta$ 2*, *TGF- $\beta$ 3*), smads, *bone morphogenetic proteins (BMPs)* aktivator dan inhibitor (Rossant and Howard, 2002). *TGF- $\beta$*  adalah sitokin dengan salah satu fungsinya meregulasi

dalam tahap diferensiasi sel endotel, pembentukan jaringan vaskular dan mempertahankan integritas dinding pembuluh darah (Pepper, 1997; Bertolino *et al.*, 2005; Wu, *et al.*, 2006). *TGF- $\beta$*  famili merupakan protein multifungsi yang menginisiasi respon seluler dengan berikatan pada dua tipe reseptor yaitu Reseptor I dalam proses aktivasi dan II sebagai reseptor serine/threonine kinase. Dalam penelitian uji genetik, *TGF- $\beta$ 1* dan reseptornya diteliti bekerja pada proses pertahanan integritas vaskular embrio (Pepper, 1997).

### 2.2.2. Regulasi Negatif Proses Vaskuloangiogenesis

Pertumbuhan dan perkembangan pembuluh darah tidak hanya membutuhkan faktor positif dalam tahapannya. Regulator negatif yang dikenal dengan istilah anti angiogenik pun dibutuhkan untuk menstabilkan keadaan dan menghindari abnormalitas yang terjadi baik tingkat sel, jaringan maupun organ. Namun apabila peran anti angiogenik tersebut berlebihan maka dapat menyebabkan gangguan pada proses pertumbuhan dan perkembangan sistem vaskular. Mekanisme apoptosis dari sel - sel endotel dibutuhkan untuk menghambat proses proliferasi dan remodeling yang berlebihan. (Dardik *et al.*, 2004). Pada tahap ini apoptosis menyeimbangkan kerja *PDGF* dan *FGF*. Mekanisme lainnya adalah *MMP* inhibitor yang mensupresi proses angiogenesis, baik proses pemanjangan maupun remodeling. Selain itu terdapat pula peran endostatin yang memecah fragmen C terminal dari kolagen XVII dan juga berikatan dengan *VEGF* dengan tujuan mengganggu ikatan dengan *VEGFR* ( Karoline, 2008 ).

## 2.3 **Klasifikasi Perkembangan Embrio**

Pembahasan secara sistematis mengenai perkembangan embrio manusia pertama kali disampaikan oleh Wilhelm His, dan publikasi dan revisi

selanjutnya oleh Franklin Mall in 1914. Dilanjutkan oleh George Streeter (Streeter, 1951). Pembahasan tidak berhenti disitu saja, namun terus berlanjut hingga sistem tahapan yang disampaikan oleh Ronan O’Rahilly in 1973 dan revisinya oleh O’Rahilly dan Müller di tahun 1987 dengan publikasinya mengenai The Carnegie Stages System (CSEHED) (O’Rahilly and Muller, 1987). Berdasarkan pada CSEHED, periode perkembangan embrio terdiri dari 23 tahapan. pada penelitian di berbagai hewan coba, umur embrio yang digunakan dimulai sejak stage 9 dari CSEHED. Hal ini disebabkan oleh embrio hewan coba pada tahapan sebelumnya belum bisa diamati dengan jelas dan kurang representatif. (Hamburger and Hamilton, 1951; O’Rahilly, 1979; O’Rahilly and Muller, 1987).

Tabel 2.1 Data Perbandingan Umur Embrio (Species/Days) (Hamburger and Hamilton, 1951; O’Rahilly, 1979; O’Rahilly and Muller, 1987 )

Species	Stage	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Human	Days	20	22	24	28	30	33	36	40	42	44	48	52	54	55	58
Baboon	Days	23	25	27	28	29	30	31	33	35	37	39	41	43	45	47
Rhesus Monkey	Days	21	22	25	28	29	30	32	34	36	37	38	40	42	44	46
Marmoset	Days	57		60		64		67				74				
Mouse	Days	9	9.5	10	10.5	11	11.5	12	12.5	13	13.5	14	14.5	15	15.5	16
Rat	Days	10.5	11	11.5	12	12.5	13	13.5	14	14.5	15	15.5	16	16.5	17	17.5
Chinese Hamster	Days	10	10.5	11	11.5	12	12.5	13	13.5	14	14.5	15	15.5	16	16.5	17
Guinea Pig	Days	14.5	15	15.5	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	29
Rabbit	Days	8	8.5	9.5	10.5	11	12	12.5	13.5	14	14.5	15.5	16	16.5	17	18
Sheep	Days	15	16	17.5	18.5	19.5	20.5	22	23	24.5	25.5	27.5	29.5	30	33	
Pig	Days	14	15	16	17	18	19	20.5	21.5	23	24	25.5	27.5	29	30.5	32.5
Chicken	Days	1	1.5	2	2.25	2.5	3	3.25	3.75	4.75	5.5	6.25	7.25	7.75	8.5	10
Dog	Days						27	28	29	30	34	36	37			

### 2.3.1. Proses Embriogenesis Sebelum Vaskuloangiogenesis

Pada tahap embriogenesis sebelum adanya vaskulogenesis, proses gastrulasi sudah terjadi sejak awal minggu pertama proses implantasi yang setara dengan embrio umur 7 hari. Pada minggu pertama, terjadi proses pembelahan hingga terbentuk morula. Ketika morula memasuki rongga rahim pada hari ketiga setelah pembuahan, mulailah terlihat sebuah rongga, dan terciptalah blastokista. Pada minggu kedua kehamilan diawali dengan munculnya hipoblas dan epiblas di awal minggu kedua. Hipoblas dan epiblas ini nantinya bersama – sama akan membentuk cakram mudigah bilaminar. Pada akhir minggu ketiga, proses gastrulasi telah berjalan sempurna yang ditandai dengan pembentukan 3 lapisan, ektoderm, mesoderm dan endoderm yang akan menjadi dasar dalam pembentukan jaringan dan organ pada embrio. Pada minggu ketiga perkembangan embrio, *primitive streak* yang bersumber dari proliferasi sel ektoderm juga mulai menyusun lapisan mesoderm dan endoderm. Penebalan dari sel ektoderm akan membentuk neural plate yang merupakan awal dari perkembangan sistem saraf. ( Bie, 2001; Altshuler *et al.*, 2003 )

Tabel 2.2 Perkembangan Organ Internal ( Bie, 2001 ).

Organ	First day of development
Heart	17
Central nervous system	18
Liver / Gall bladder	18
Kidney	22
Somites	20-30
Lungs	25
Gonads (indifferent)	23
Thyroid gland	33
Pancreas	30

### 2.3.2. Proses organogenesis pada embrio hingga tengah minggu ke-4

#### 2.3.2.1. Stage 9 ( embrio manusia umur 20 – 22 hari; 1 – 4 somit; Embrio ayam umur 24 – 36 jam)

Pada stage 9, proses gastrulasi pada embrio sudah mencapai tahap akhir ditandai dengan pembentukan *trilaminar disc*. Munculnya somit dimulai pada stage 9 dari umur embrio. sekitar 1- 4 pasang somit mulai muncul yang diasumsikan akan berkembang membentuk bagian oksipital embrio. satu pasang somit di bagian kaudal akan ikut membentuk piringan notochord. Pada tahap ini, lempeng saraf yang terbentuk pada stage 8, sudah membentuk kedalaman, namun masih tetap terbuka. Fase tersebut dikenal dengan istilah *neural groove*. Perkembangan sistem kardiovaskular pada tahap ini ditandai dengan mulai terbentuknya *vascular tube* di beberapa bagian seperti korion, vesikel plasenta dan embrio proper bersama dengan amnionnya. Hubungan antara pembuluh darah ini terjadi secara bertahap, dan berkembang di tempat berbeda sesuai tahapannya. (O'Rahilly and Muller, 1987; Gilbert-barness *et al.*, 2004 )

#### 2.3.2.2. Stage 10 (embrio manusia umur 22- 24 hari; 4 – 12 somit; embrio ayam umur 36 – 48 jam )

Pada tahap ini, sulkus optikus mulai terbentuk. Arcus pharyngeal pertama mulai muncul. Proses perkembangan intraembrio sejauh ini terdiri dari beberapa peristiwa, seperti proses cardiac looping mulai ada, perkembangan sulcus laryngeotracheal. Dalam sistem saraf, tahap perkembangan somit 4 - 12 ini merupakan tahap penting ditandai dengan peninggian neural groove hingga membentuk *neural fold*. *Neural fold* saling mendekat di garis tengah, dan akhirnya bersatu yang menandai awal pembentukan *neural tube*. Penyatuan ini dimulai pada daerah leher dan berlanjut ke arah sefalik dan kaudal. Namun pada

ujung cranial dan kaudal mudigah, penyatuan agak tertunda sehingga neuropore anterior dan posterior tersebut membentuk hubungan langsung antara rongga *neural tube* dengan amnion. Perkembangan sistem saraf di awal pertumbuhan embrio melalui mekanisme kompleks yang melibatkan perubahan pola, bentuk dan migrasi dari sel neural dalam perkembangan *neural tube* dan penutupan pada bagian rostral yang dikenal dengan istilah neuropore anterior (Brook *et al.*, 1991; Copp *et al.*, 1988; Estibeiro *et al.*, 1993; Padmanabhan, 2006). Seiring dengan pembentukan *neural tube*, pada tahap ini pula, neuropore anterior juga mulai menutup. Pelebaran tabung ini pada bagian akhir *cephalic* sudah mulai terlihat yang mengindikasikan adanya flexi cranial. Flexi cranial diartikan sebagai keadaan menekuknya area kepala secara ventral menuju area *yolk sac* dan ditandai dengan adanya tonjolan ventral dan pemanjangan area prosencephalon (Bellairs and Osmond, 2005). Sedangkan pada perkembangan organ mata, sulcus optikus sudah mulai berkembang dari area forebrain (O'Rahilly and Muller, 1987; Gilbert-barness *et al.*, 2004).

#### 2.3.2.3. Stage 11 (embrio manusia umur 24 - 28 hari; 12 – 20 somit; embrio ayam umur 48 – 54 jam)

Secara ekstenal perkembangan dari tahap ini terjadi proses penutupan neuropore anterior. Proses evaginasi dari optik sudah terbentuk dari sulkus optikus. Pada perkembangan mata, optic *vesicle* dan otic pit juga sudah mengalami proses pembentukan. Pada intra embrio, perkembangan sinus venosus sudah mulai terjadi. Proses penutupan neuropore anterior juga sudah terbentuk sempurna. Selain itu, *neural tube* juga sudah sempurna terbentuk (O'Rahilly and Muller, 1987; Gilbert-barness *et al.*, 2004).



## 2.4 Curcumin

Kunyit (*Curcuma longa*) mengandung banyak bahan fitokimia, seperti *curcumin*, *demethoxycurcumin*, *bisdeethoxycurcumin*, *zingiberene*, *curcumenol*, *curcumol*, *eugemol*, *tetrahydrocurcumin*, *triethylcurcumin*, *turmerin*, *turmerones* dan *turmeronols* ( Aggarwal *et al*, 2006). Zat dari kunyit yang memberi warna kuning adalah curcumin. *Curcuma longa* mengandung sekitar 2 - 5 % jumlah curcumin. Curcumin berupa bubuk berwarna kuning – oranye memiliki karakteristik kurang larut dalam air, tetapi dapat larut dalam ethanol, *Dimethylsulfoxide* ( *DMSO* ) dan Aseton. Curcumin yang memiliki rumus molekul  $C_{21}H_{20}O_6$  dan berat molekul 368.37 g/mol ini meleleh pada suhu 183° C.

Sejak dahulu, sudah banyak dilakukan penelitian mengenai efek curcumin yang memiliki efek terapi. Dalam berbagai penelitian, hasil menunjukkan bahwa curcumin berperan sebagai anti inflamasi, antioksidan (Kunchandy, 1990) anti karsinogenik (Huang *et al.*, 1994; Babu and Srinivasan, 1997), hipolipidemia dan anti diabetes ( Arun and Nalini, 2002). Hasil penelitian menunjukkan bahwa efek anti kanker dari curcumin karena zat ini bersifat anti angiogenik (Li *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007; Oyagbemi *et al.*, 2010).

## 2.5 Farmakokinetik dan Farmakodinamik Curcumin

Proses farmakokinetik dari curcumin pada tikus sudah diteliti dalam 30 tahun terakhir. Berdasarkan beberapa riset yang ada, curcumin memiliki metabolisme yang cepat dan efisien yang menyebabkan berkurangnya bioavailabilitas dari curcumin. Pada penelitian dengan menggunakan hewan coba tikus, dosis 1 g/kg berat badan tikus, curcumin mengalami proses administrasi dalam tubuh tikus hingga dapat dideteksi pada feses dan pada urin. pada artikel lainnya, absorpsi dari curcumin via oral mencapai hingga 60 %. Pada

penelitian bioavailabilitas curcumin, ekskresi yang paling banyak adalah melalui feses. Pada penelitian lainnya, paparan curcumin melalui jalur intravena dan intraperitoneal pada tikus, ternyata ditemukan jumlah yang besar pada proses metabolisme di saluran empedu. Setelah dosis intravena diinjeksikan, sekitar 50 % dosis diekskresikan pada saluran empedu dalam waktu 5 jam. Interpretasi dari penelitian yang dibuktikan dapat dijelaskan bahwa biotransformasi dari curcumin pada proses absorpsi terjadi di usus dan mengalami siklus enterohepatik. Pada penelitian klinis, curcumin memiliki bioavailabilitas sistemik yang rendah bila diberikan melalui oral. ( Perkins *et al*, 2002; Joe *et al*, 2004 )

Proses farmakodinamik dari curcumin juga sudah banyak diteliti dan membantu dalam proses patofisiologi penyakit. Banyak riset menjelaskan bahwa curcumin berperan sebagai *chemoprevention* dari kanker. Curcumin menghambat dan meregulasi negatif dari protein kinase dan reseptornya. Curcumin juga mensupresi faktor – faktor inflamasi seperti *Tumor necrosis factor (TNF)* dan *Nuclear factor Kappa-B (NF-κB)* yang berperan pula dalam patofisiologi kanker. Berbagai aktivitas baik sebagai anti inflamasi, anti kanker, antioksidan ini juga mengindikasikan bahwa curcumin dapat berperan pula di banyak jalur dalam berbagai level dan menghambat proses angiogenesis, ikatan antar sel dan enzim seluler. ( Sharma *et al*, 2001; Joe *et al*, 2004 )

## **2.6 Peran Curcumin dalam Menghambat Proses Angiogenesis**

Sampai saat ini mekanisme awal curcumin dalam proses angiogenesis belum sepenuhnya dimengerti. Curcumin berperan dalam berbagai mekanisme pada proses angiogenesis normal sebagai penghambat dan mensupresi faktor faktor molekuler yang berperan dalam proses ini. Contohnya, curcumin menghambat proliferasi pada berbagai jalur molekuler diantaranya *VEGF*, *FGF*,

dan  $TGF-\beta$ . Semua faktor tersebut merupakan pro angiogenik menduduki mekanisme berbeda dan saling melengkapi satu dengan yang lainnya.

Dalam penelitian secara *in vivo* menggunakan hewan coba tikus, selain berperan sebagai anti angiogenik pada tahap angiogenesis normal, curcumin juga dilaporkan dapat menghambat angiogenesis pada proses patologis yaitu kanker prostat. Atas dasar berbagai riset tersebut, peran curcumin dalam dunia kedokteran terus dikembangkan. Sebagai pengobatan dan suplemen curcumin juga tersedia untuk mengatasi berbagai masalah kesehatan. Namun perlu diperhatikan lagi efek curcumin yang dapat mempengaruhi pertumbuhan janin berdasarkan sifatnya sebagai zat anti angiogenik (Chen *et al.*, 2010; Shiau *et al.*, 2011 ).

## 2.7 Efek Curcumin pada embrio

Penelitian mengenai pengaruh curcumin terhadap embrio masih sangat terbatas dan belum bisa merepresentasikan kondisi perkembangan fetal. Dalam beberapa tahun terakhir, marak penelitian yang menunjukkan efek terapi dari curcumin. Namun penelitian tentang pengaruh curcumin pada embrio sangat kurang dan belum bisa digeneralisasi pengaruhnya pada manusia. Sejauh ini belum diketahui bukti nyata pengaruh curcumin terhadap perkembangan embrio. Penelitian yang dilakukan pada tahun 1980 menunjukkan bahwa curcumin tidak meningkatkan tingkat kelainan pada kandungan, bayi yang dilahirkan dan infertilitas pada hewan coba tikus (Vijayalaxmi, 1980).

Curcumin yang memiliki peran sebagai antioksidan dan anti inflamasi pada mekanisme stres oksidatif yang disebabkan menjadi dasar pada penelitian Hsuuw *et al* di embrio tikus pada fase blasokista. Hasil penelitian tersebut menunjukkan curcumin mencegah *Methylglyoxal (MG)* sehingga kerusakan pada

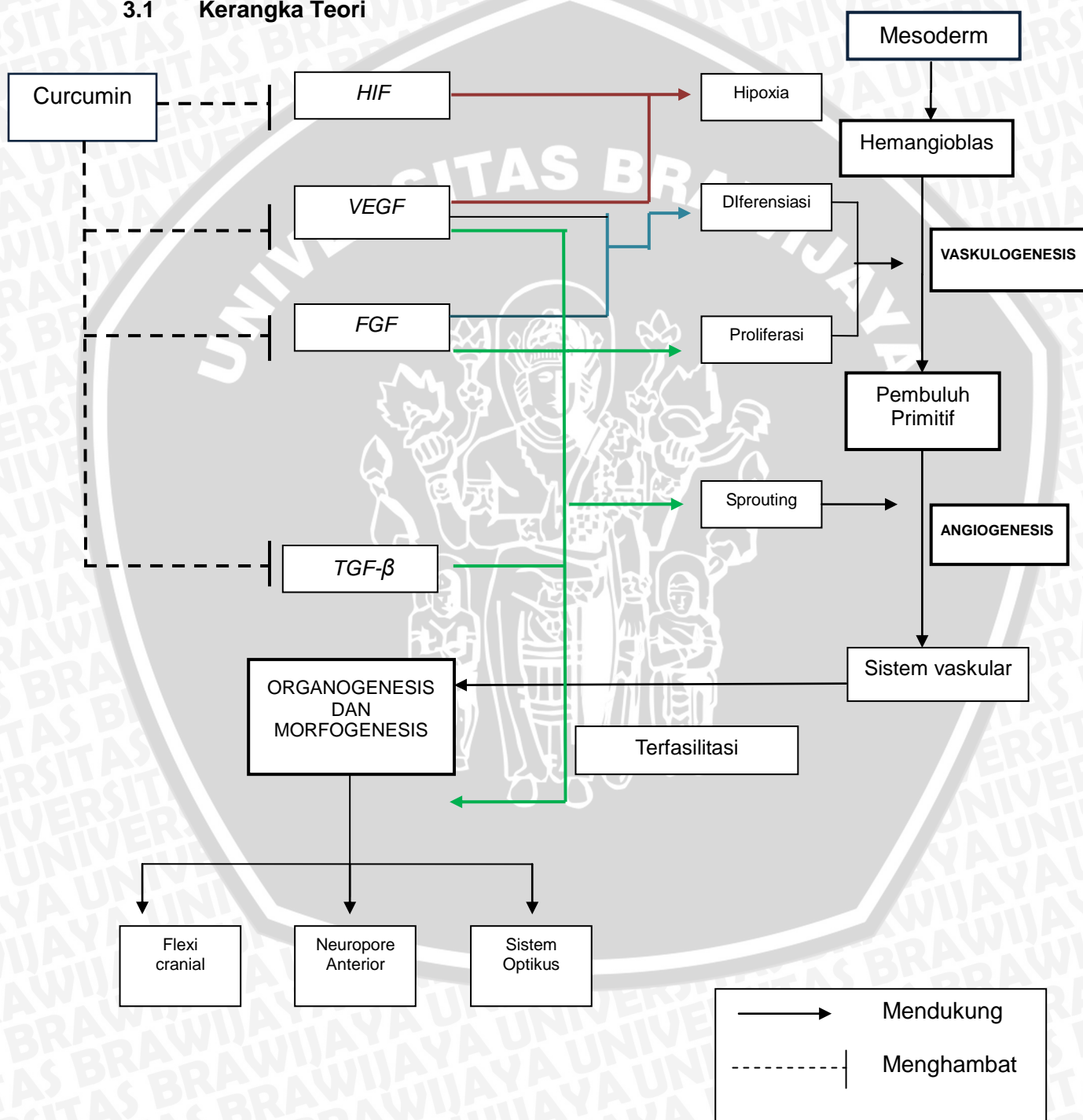
perkembangan embrio tidak terjadi (Hsuuw *et al*, 2005). Namun pada penelitian lainnya, menunjukkan hasil bahwa curcumin mensupresi proses maturasi dari oosit embrio tikus. Penelitian ini dilaksanakan secara *in vitro* dan *in vivo*. Penelitian secara *in vitro* dari perlakuan curcumin menunjukkan penurunan berat pada embrio tikus. Penelitian secara *in vivo* pada embrio tikus, curcumin menunjukkan efeknya dalam menurunkan maturasi dari oosit embrio. Kemudian perlakuan dengan *caspase-3-specific inhibitor* efektif menghambat curcumin. Kesimpulan dari penelitian tersebut adalah mekanisme curcumin dalam menurunkan maturasi oosit embrio tikus melalui jalur apoptosis (Chen and Chan 2012).

Pada penelitian Yadav and Aggarwal menunjukkan bahwa curcumin menghambat proliferasi *Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC)* secara *in vitro* dan menonaktifkan respons dari *FGF-2* secara *in vivo* (Yadav and Aggarwal, 2011). Pada penelitian yang dilakukan di tahun 2003 dan tahun 2010 menggunakan hewan coba *zebrafish* dan tikus menunjukkan apoptosis sel – sel embrio. Adapun akibat yang ditunjukkan pada penelitian tersebut adalah retardasi dalam proses absorpsi di *yolk sac*, ukuran tubuh yang mengecil dan edema pada perikardium (Shiau *et al*, 2011).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori



**Keterangan Skema :**

Pada minggu ketiga kehamilan, Sel - sel hemangioblast yang bersumber dari lapisan mesoderm, mulai berproliferasi dan bermigrasi membentuk *blood island*. Proses ini tidak lepas dari peran molekuler, *HIF* ( *Hipoxia Inducible Factor* ) dan *VEGF* ( *Vascular Endothelial Growth Factor* ). Proses berlanjut dengan tahap diferensiasi dari sel - sel Hemangioblas menjadi sel endotel yang diperankan oleh *FGF* ( *Fibroblast Growth Factor* ) dan *VEGF* dan mengawali tahap vaskulogenesis. Pada tahap vaskulogenesis terjadi proliferasi sel endotel dengan bantuan *TGF- $\beta$*  ( *Tumor Growth Factor* ), *FGF* dan *VEGF*. Selain itu terjadi proses pembentukan vascular tube hingga terbentuk pembuluh darah primitif. Setelah proses vaskulogenesis, tahap selanjutnya adalah proses angiogenesis. pada tahap angiogenesis terjadi proses sprouting dan remodelling dari pembuluh darah yang diperankan terutama oleh *FGF*, *TGF- $\beta$*  dan *VEGF*. Proses stabilisasi *vascular network* oleh peran *TGF- $\beta$*  juga terjadi pada proses angiogenesis.

Proses vaskularisasi sel endotel hingga tahap angiogenesis yang sesuai akan mendukung proses organogenesis dan morfogenesis. Proses organogenesis dan morfogenesis tidak lepas dari peranan *FGF*, *VEGF* dan *TGF- $\beta$* . Curcumin yang merupakan zat yang bersifat anti angiogenik berperan dalam menghambat proses vaskuloangiogenesis, organogenesis hingga morfogenesis. Pada skema, curcumin menghambat pada beberapa tahap di jalur tersebut. Pertama, curcumin menghambat sekresi *HIF* yang menginisiasi proses migrasi dan pembentukan sel angioblas dari lapisan mesoderm embrio. Kedua, curcumin menghambat proses diferensiasi sel hemangioblas menjadi sel endotel dengan mensupresi *FGF*, *VEGF*. Ketiga, curcumin juga menghambat tahapan *sprouting* dengan menekan pembentukan *TGF- $\beta$* , *FGF* dan *VEGF*. Curcumin yang

menghambat proses vaskulo-angiogenesis melalui supresi faktor molekular yang juga memfasilitasi organogenesis dan morfogenesis embrio dapat menyebabkan akibat yang berhubungan antara dua proses penting tersebut. Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan indikator perkembangan embrio sesuai penelitian Hamburger-Hamilton dan Drake *et al* yaitu pengamatan pada sirkulasi *yolk sac*, flexi cranial, neuropore anterior dan sistem optikus. (Hamburger and Hamilton, 1951; Drake *et al.*, 2006).

### 3.2 Hipotesa

Berdasarkan kerangka konsep di atas, maka hipotesis utama dari penelitian ini adalah Curcumin dapat menghambat proses vaskulo-angiogenesis yang terjadi pada embrio ayam dengan umur 48 jam.

Di samping itu dapat diuraikan sub hipotesis dari penelitian ini sebagai berikut :

1. Paparan curcumin menghambat perkembangan sirkulasi *yolk sac* pada embrio ayam.
2. Paparan curcumin menghambat proses flexi cranial pada embrio ayam.
3. Paparan curcumin menghambat proses penutupan neuropore anterior pada embrio ayam.
4. Paparan curcumin menghambat perkembangan sistem optikus pada embrio ayam.

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimental murni dengan menggunakan rancangan *randomized control group post test design* untuk mengetahui pengaruh curcumin terhadap proses vaskulo-angiogenesis disertai organogenesis dan morfogenesis embrio ayam umur 48 jam. (Rahayu,2011). Embrio ayam diberi perlakuan dan diinkubasi selama 48 jam sebanding dengan umur kehamilan manusia 24 hari saat sistem vasular sudah terbentuk dan jantung mulai memompa darah sebagai tanda awal berfungsinya sistem kardiovaskular pada tahap organogenesis (O’Rahilly, 1979; O’Rahilly and Muller, 1987). Penggunaan embrio ayam dalam penelitian ini didukung oleh berbagai faktor dari penelitian sebelumnya. Dari segi harga, embrio ayam lebih murah dibandingkan dengan hewan coba lainnya. Hasil menunjukkan bahwa embrio ayam baik digunakan sebagai model pembelajaran perkembangan hematopoiesis. Ini didukung dari berbagai model pembelajaran, embrio ayam dapat menjelaskan informasi baik secara molekuler maupun genomik mengenai perkembangan *hematopietic* dan morfogenesis serta abnormalitasnya. ( Stern, 2004; Sheng, 2010 ).

#### 4.2 Populasi dan Sampel

##### 4.2.1 Populasi

Populasi yang digunakan sebagai hewan coba adalah embrio ayam. Spesies ayam adalah *Gallus gallus* strain Cobb. Tahap perkembangan embrio



ayam mengikuti tabel Hamburger dan Hamilton.

#### 4.2.2 Sampel

Besar sampel penelitian ditentukan berdasarkan rumus Steell dan Torrie (1991).

$$N = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 \cdot \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan :

- n = Besar sampel  
 $Z\alpha$  = Harga standar  $\alpha$  0,05 (satu arah) = 1,65  
 $Z\beta$  = Harga standar  $\beta$  = 0,84  
 $\sigma$  = Standar deviasi  
d = Beda mean kelompok kontrol dan perlakuan

Dengan menganggap bahwa populasi berdistribusi normal dan perbedaan rata-rata antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan mempunyai perbedaan (d) sebesar  $\sigma$  (1 standar deviasi) sehingga  $\sigma^2 / d^2 = 1$ , maka  $n = (Z\alpha + Z\beta)^2$ . Berdasarkan perhitungan rumus tersebut maka  $n = 6,2$  sehingga besar sampel minimal yang digunakan adalah 7 butir telur tetas untuk setiap kelompok.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas

Paparan curcumin

#### 4.3.2 Variabel Terikat

- Sirkulasi *yolk sac* embrio ayam umur 48 jam
- Flexi cranial embrio ayam umur 48 jam
- Neuropore anterior embrio ayam umur 48 jam
- Sistem optikus embrio ayam umur 48 jam

### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Anatomi histologi dan

laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya Malang, dilaksanakan dalam waktu 3 bulan ; terhitung April 2012.

#### 4.5 Instrumen Penelitian

Untuk perlakuan

- Mesin penetas
- *Disposable syringe* 1 cc
- *Disposable syringe* 5cc
- *Falcon*
- Jarum suntik 1,5 inchi, 20G.
- Plester bulat kecil (Plesterin)
- 2 buah handuk kering
- *Vinyltape*
- Spidol
- *Lancing device*

Untuk pengambilan bahan coba

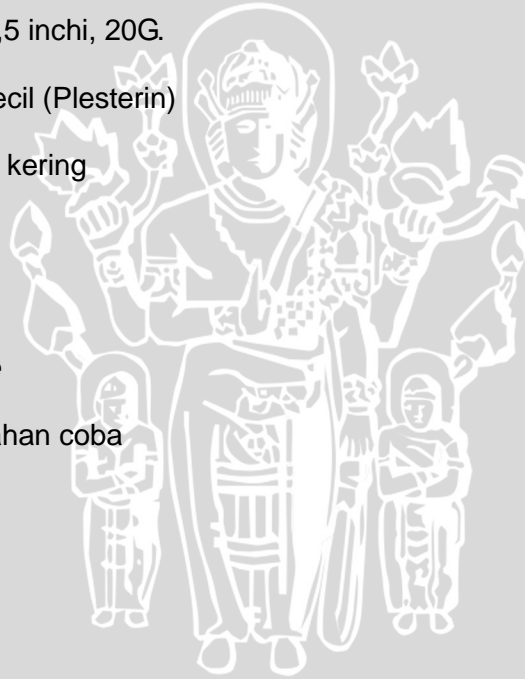
- *Dissecting set*
- Alcohol Swab
- Tisu
- *Petri dish*
- *Ice tray* untuk fiksasi organ
- Bingkai kertas saring ukuran 1,4 X 1,4 cm

Untuk fiksasi bahan coba

- Formaline 10 %

Untuk Pengecatan Imunohistokimia

- Pipet tetes



- Objek glass
- PBS steril
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 %
- Methanol
- 0,25% triton-x100
- Buffer BSA
- Antibodi VEGF
- Anti- Rabbit
- SAHRP Kit
- Akuades steril
- DAB
- Buffer DAB
- Mayer
- Tap water
- Entellan

#### 4.6 Definisi Operasional

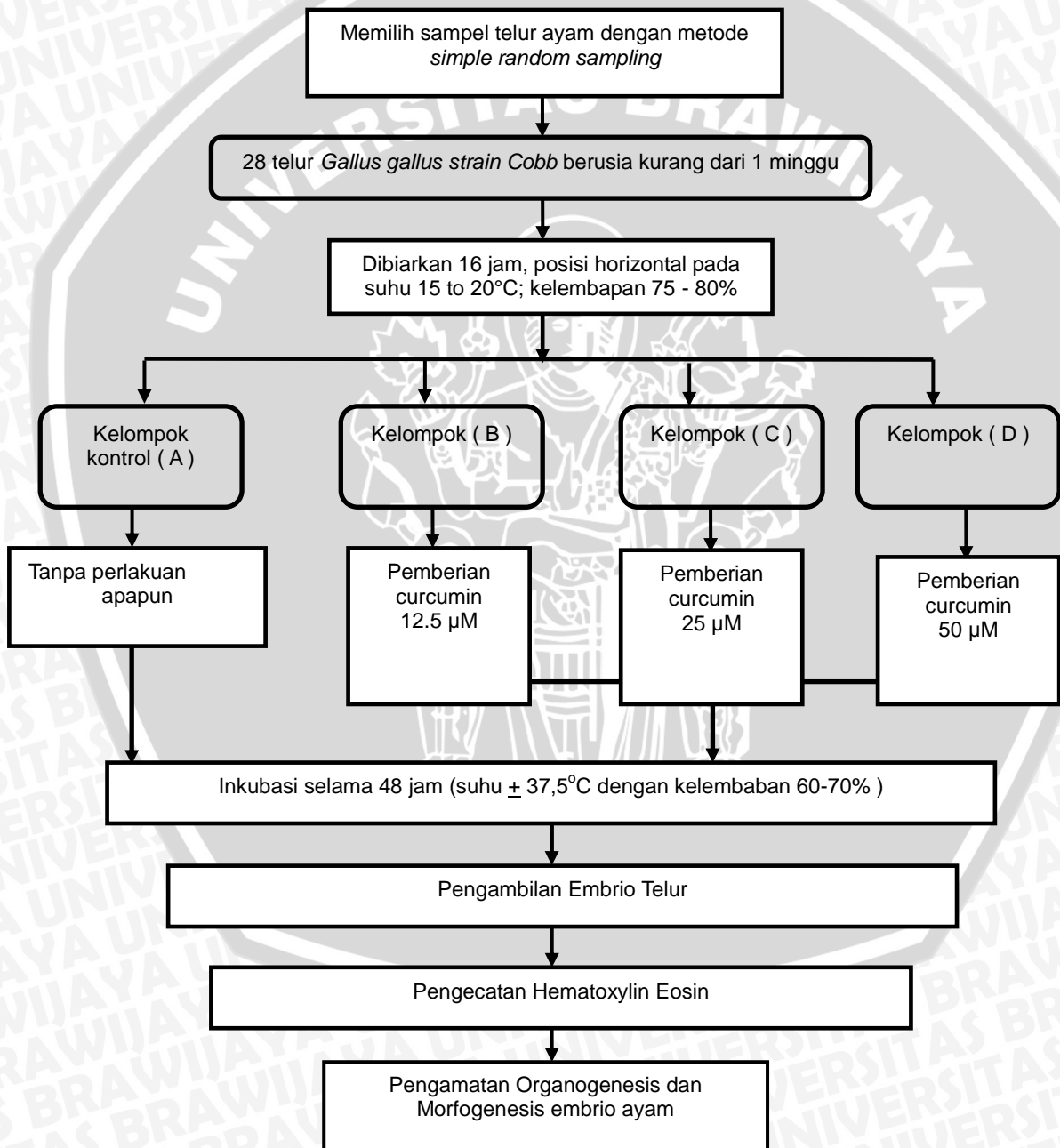
- a. Embrio ayam adalah embrio dalam telur ayam yang telah dibuahi pada stadium HH 11-12.
- b. Paparan curcumin adalah pemberian curcumin secara *in ovo* melalui injeksi curcumin ke dalam yolk telur ayam.
- c. Paparan curcumin adalah pemberian curcumin secara *in ovo* melalui injeksi curcumin ke dalam yolk telur ayam tetas.
- d. Waktu pemaparan adalah waktu saat injeksi curcumin ke dalam telur ayam yang berusia kurang dari satu minggu dari waktu ditelurkan, dan dilanjutkan dengan penginkubasian telur selama 48 jam.



- e. proses organogenesis dan morfogenesis pada embrio ayam berdasarkan pengecatan Imunohistokimia dengan parameter yang diamati flexi cranial, neuropore anterior dan sistem optikus.

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Bagan Alur Penelitian

#### 4.7.2 Pembagian Kelompok

Telur ayam yang telah dibuahi dibagi menjadi 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. (Chandru H and Sharada A.C. 2007; Shankar *et al*, 2007; Chen *et al*, 2010 ).

Distribusinya sebagai berikut:

Kelompok A : Hanya PBS 200  $\mu$ L Sebagai kontrol negatif.

Kelompok B : Dengan perlakuan curcumin 12,5  $\mu$ M dalam PBS, 200  $\mu$ L

Kelompok C : Dengan perlakuan curcumin 25  $\mu$ M dalam PBS, 200  $\mu$ L

Kelompok D : Dengan perlakuan curcumin 50  $\mu$ M dalam PBS, 200  $\mu$ L

#### 4.7.3 Pra-perlakuan

Telur harus berusia kurang dari 1 minggu (dihitung dari hari saat ditelurkan). Semua telur disimpan dalam suhu ruang, diposisikan horizontal selama setidaknya 16 jam pada suhu 15 hingga 20°C; kelembapan 75 - 80% untuk memastikan posisi yolk berada di tengah. Inkubator juga disiapkan stabil pada suhu 37,5° – 38,5° C. (Fasenko, 2007).

#### 4.7.4 Perlakuan

Semua perlakuan dilakukan *in ovo* secara injeksi dengan menggunakan *disposable syringe* 1 cc hingga bagian tengah telur. Injeksi dilakukan pada ujung tumpul telur, dengan tidak merubah posisi sebelumnya. Sebelum injeksi, area injeksi diusap dengan tissue beralkohol sekali pakai (*alcohol swab disposable*). Setelah selesai injeksi, ditutup dengan *vinyltape*. Kemudian posisi telur dibalik 180° sesuai axisnya. Kemudian diinkubasi pada suhu 37,5° – 38,5° C selama 48 jam.

#### 4.7.5 Perlakuan dengan Curcumin

Curcumin dengan kisaran dosis 12,5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M dan 50  $\mu$ M dikonversikan

dengan satuan gram (g) menjadi 4,6 mg, 9,2 mg, 18,4 mg. Kemudian, curcumin ditimbang dan dilarutkan pada DMSO 1 mg/ml. Selanjutnya masing - masing dosis dilarutkan pada PBS 200  $\mu$ l dan larutan dimasukkan pada spuit 1 cc pada ruang kultur. Dalam berbagai dosis tersebut. Curcumin injeksikan pada yolk telur ayam. Sebagai kontrolnya diinjeksikan PBS 200  $\mu$ L.

#### 4.7.6 Inkubasi

Inkubasi telur ditempatkan pada inkubator suhu  $\pm$  37,5°C dengan kelembaban 60-70% selama 48 jam. Telur diletakkan pada posisi horizontal sesuai posisi setelah injeksi.

#### 4.7.7 Pengambilan Bahan Coba

Memecahkan cangkang telur dengan mengetukkan dasar telur pada bidang yang agak tajam, dengan tidak merubah posisi telur. Tuang telur dalam dish yang telah setengahnya diisi dengan Larutan *Natrium Clorida (NaCl)* 0,9% (NS). Ambil gambar, letakkan bingkai kertas saring di atas blastodisk (embrio) sehingga nampak perlahan-lahan menjadi basah. Kemudian gunting *vitelline membrane* di sisi luar bingkai kertas. Angkat bingkai kertas saring, sehingga embrio ikut menempel pada lubang di bingkai kertas saring. Masukkan dalam larutan NS yang lain dan goyang-goyangkan beberapa kali. Kemudian pindahkan lagi dalam larutan NS yang lain dan goyang-goyangkan beberapa kali.

#### 4.7.8 Pengambilan Gambar

Pengambilan dilakukan dengan kamera digital sesaat setelah cangkang telur dibuka untuk memberikan gambaran terbaik dari embrio.

#### 4.7.9 Penyimpanan Bahan Coba

Embrio dimasukkan dalam formalin 10%. Embrio dapat disimpan selama satu bulan, dan siap untuk dicat. Pada penelitian ini fiksasi dilakukan selama satu

minggu, kemudian dicat dalam hal ini dengan pengecatan Imunohistokimia.

#### 4.7.10 Pengecatan Imunohistokimia

Setelah proses fiksasi yang optimal, Slide preparat embrio ayam siap dicat dengan metode imunohistokimia. Pertama, Slide dicuci PBS steril 3x5 menit dan dikeringkan dengan tisu. Menambahkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % dalam methanol inkubasi 15 sampai dengan 20 menit dilanjutkan dicuci dengan PBS steril 3 x 5 menit. Tahap bloking unspesifik protein, diawali dengan penambahan 0,25% triton-x100 dalam blocking buffer BSA selama 1 jam pada suhu ruang serta dicuci PBS steril 3x5 menit. Tahap selanjutnya adalah menambahkan antibodi primer pada slide yaitu anti-VEGF dalam blocking buffer BSA. Kemudian Slide diinkubasi semalam pada suhu 4°C dilanjutkan dengan dicuci PBS steril 3 x 5 menit.

Tahap selanjutnya adalah penambahan antibodi sekunder kit pada slide, kemudian inkubasi selama 60 menit pada suhu kamar. Setelah itu dicuci PBS steril 3 x 5 menit. Menambahkan SAHRP Kit pada slide embrio. Kemudian diinkubasi 40 menit pada suhu kamar dan dicuci dengan PBS steril 3x 5 menit lalu dicuci akuades steril 3 x 5 menit. Tahap selanjutnya adalah slide ditambahkan dengan ( DAB: Buffer DAB = 1:50 ) lalu diinkubasi selama 20 menit pada suhu kamar. Kemudian slide dicuci dengan PBS steril 3 x5 menit. Slide embrio ditambahkan dengan ( Mayer : Tap water = 1 : 10 ), lalu diinkubasi 5 - 10 menit pada suhu kamar. Kemudian slide dicuci tap water steril 3 x 5 menit dan dikering anginkan. Tahap selanjutnya adalah proses Mounting dengan entellan. Terakhir, slide siap diamati di bawah mikroskop.

#### 4.7.11 Pengamatan Mikroskop

Sediaan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran mikroskop 40x hingga 100x.

#### 4.7.12 Pengamatan Morfologis Embrio

Setelah dilakukan pengambilan gambar secara digital, hasil foto kemudian dicetak dalam ukuran 5R, dan digunakan untuk pengamatan lebih lanjut Untuk indikator pertumbuhan dan perkembangan embrio dalam penelitian ini dilakukan berdasarkan tabel skor Drake (Drake *et al.*,2006)

Tabel 4.1 Skor Embrio ( Drake *et al.*, 2006 )

Parameter	0	1	2	3	4	5	6
Yolk sac circulation			No distinct sinus terminalis	Distinct sinus terminalis	Circulation; established vascular network		
Neuropore anterior			Open	Closed			
Flexi cranial		No flexure	Cranial flexure indicated	Slight cranial flexure	Cranial flexure	Broad curve	Forebrain and hindbrain axes at 90 degrees
Optic system	No optic development		Optic vesicles presents				

#### 4.8 **Analisa Data**

Skor embrio dianalisa dengan analisis varian (ANOVA). (Dahlan, 2001). Masing – masing aspek pada tabel skor diamati dan dianalisa dengan analisis chi square pada sirkulasi *yolk sac*, flexi cranial, neuropore anterior dan sistem optikus. Analisa data yang digunakan adalah software SPSS ver 17.



## BAB V

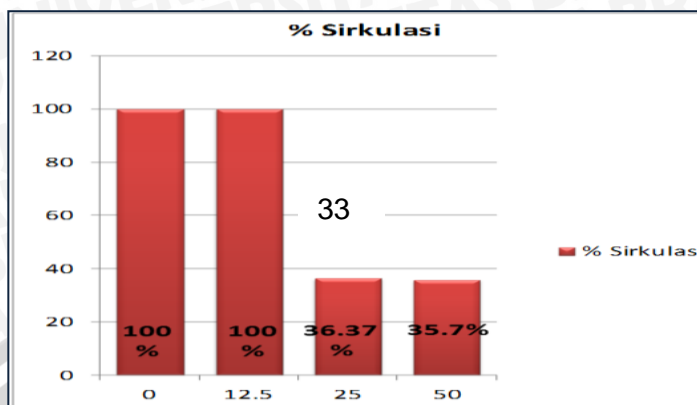
## HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

5.1 Sirkulasi *Yolk Sac*

Hasil pengamatan keberadaan sirkulasi *yolk sac* embrio yang dipapar curcumin selama 48 jam dapat dilihat pada tabel dan grafik berikut. Pada tahap ini, sirkulasi *yolk sac* terbentuk dengan adanya sinus terminalis. Pengamatan keberadaan sirkulasi *yolk sac* embrio menunjukkan penurunan sesuai dengan dosis perlakuan. Penurunan persentase sirkulasi *yolk sac* yang signifikan terjadi pada dosis 25  $\mu\text{M}$ . Berdasarkan uji Chi-square diketahui terdapat penurunan yang signifikan ( $p < 0.05$ ).

Tabel 5.1. Hasil Pengamatan Sirkulasi *Yolk Sac* Pada Embrio Ayam Umur 48 Jam Dengan Paparan Curcumin

Konsentrasi Injeksi	Total	Sirkulasi Embrio (+)	+ Sirkulasi (%)
0	12	12	100
12,5	15	15	100
25	11	4	36.37
50	14	5	35.7



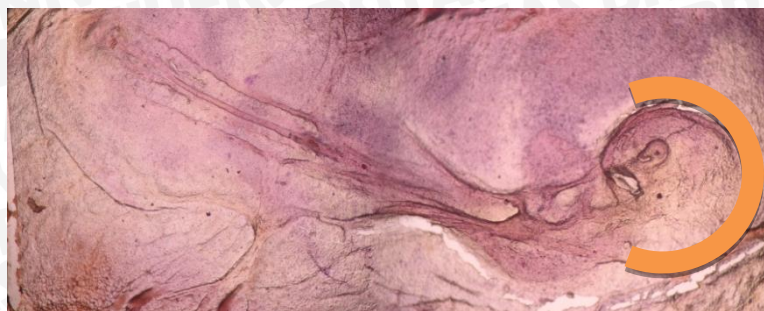
Gambar 5.1 Hasil Pengamatan Sirkulasi *yolk sac* pada Embrio ayam umur 48 jam

## 5.2 Flexi Cranial

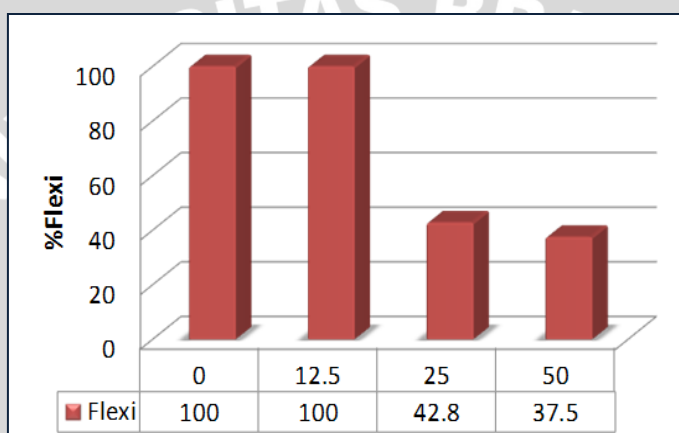
Flexi cranial merupakan salah satu parameter yang digunakan dalam perhitungan skor total embrio. Persentase jumlah embrio yang telah mengalami flexi cranial disajikan dalam tabel di berikut. Pengamatan flexi cranial embrio pada penelitian ini menunjukkan adanya kecenderungan untuk menurun sesuai dengan dosis perlakuan curcumin. Berdasar uji statistik menggunakan uji Chi square diketahui penurunan tersebut bermakna secara statistik ( $p < 0.05$ ).

Tabel 5.2 Hasil Pengamatan Flexi Cranial pada Embrio ayam umur 48 jam dengan Paparan Curcumin

Konsentrasi Injeksi Curcumin ( $\mu\text{M}$ )	% Flexi
0	100
12,5	100
25	42.8
50	37.5



Gambar 5.2 Flexi cranial pada embrio ayam 48 jam



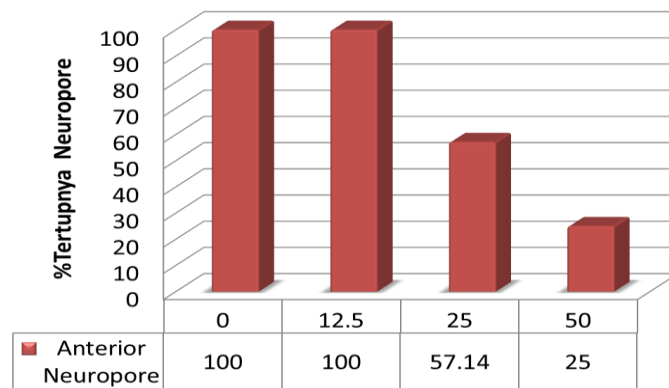
Gambar 5.3 Hasil Pengamatan Flexi Cranial pada Embrio Ayam Umur 48 jam

### 5.3 Neuropore Anterior

Pengamatan neuropore embrio pada penelitian ini menunjukkan adanya kecenderungan untuk menurun sesuai dengan dosis perlakuan curcumin. Berdasar uji statistik menggunakan uji Chi square diketahui penurunan tersebut bermakna secara statistik ( $p < 0.05$ ).

Tabel 5.3 Hasil Pengamatan Neuropore Anterior pada Embrio ayam umur 48 jam dengan Paparan Curcumin

Konsentrasi Injeksi Curcumin (µM)	% Tertutupnya Neuropore Anterior
0	100
12,5	100
25	57.14
50	25



Gambar 5.4 Hasil Pengamatan Tertutupnya Neuropore Anterior pada Embrio Ayam Umur 48 jam

#### 5.4 Sistem Optikus

Pengamatan sistem optikus embrio pada penelitian ini menunjukkan adanya kecenderungan untuk menurun sesuai dengan dosis perlakuan curcumin. Berdasar uji statistik menggunakan uji Chi square diketahui penurunan tersebut bermakna secara statistik ( $p < 0.05$ ).

Tabel 5.4 Hasil Pengamatan Keberadaan Sistem Optikus pada Embrio ayam umur 48 jam dengan Paparan Curcumin

Konsentrasi Injeksi Curcumin ( $\mu\text{M}$ )	% Keberadaan Sistem Optikus
0	100
12,5	90.9
25	42.87
50	37.5

%Keberadaan Sistem Optikus				
	0	12.5	25	50
Keberadaan Sistem Optikus	100	90.9	42.87	37.

Gambar 5.5 Hasil Pengamatan Keberadaan Sistem Optikus pada Embrio Ayam Umur 48 jam

### 5.5 Skor Total Embrio

Dalam penelitian ini skor total embrio terdiri dari sirkulasi *yolk sac*, neurupore anterior, sistem optik dan flexi cranial. Sistem pembobotan tiap parameter tidak sama, dengan flexi cranial sebagai indikator dengan rentang nilai paling luas sehingga skor total embrio banyak dipengaruhi oleh parameter ini. Hasil perhitungan skor total berdasarkan uji ANOVA bermakna secara statistik ( $p < 0.05$ )

Tabel 5.5 Hasil Perhitungan Jumlah Skor Embrio Total pada Embrio Ayam Umur 48 jam dengan Paparan Curcumin

Konsentrasi ( $\mu\text{M}$ )	Skor	SD	SEM
0	11.43	0.532	0.202
12.5	11.09	1.221	0.368
25	7.43	2.699	1.020
50	6.63	1.188	0.420

## BAB VI PEMBAHASAN

### 6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Proses embriogenesis diawali dari perkembangan sistem kardiovaskular. Sistem kardiovaskular ini akan menopang perkembangan sistem tubuh lainnya. Sistem vaskular terbentuk diawali dari proses vaskuloangiogenesis yang akan menggantikan proses difusi sebagai sistem transportasi nutrisi dan O<sub>2</sub> pada embrio ( Crivellato, 2011 ). Tahapan vaskuloangiogenesis akan berlanjut hingga membentuk jaringan pembuluh darah dan pleksus vaskular dari embrio. Vaskularisasi tersebut akan memainkan peranannya dalam perkembangan sel – sel yang akan mendukung proses organogenesis pada embrio. ( Coultas *et al.*, 2005 ; Cleaver and Melton, 2003). Proses tersebut didukung oleh berbagai faktor molekular baik pertumbuhan dan transkripsi sebagai pro angiogenik bagi embrio. Adapun faktor pro angiogenik tersebut diantaranya *VEGF*, *bFGF*, *TGF-β*, dan masih banyak lagi faktor pendukung lainnya baik molekular maupun seluler. ( Adams and Alitalo, 2007 )

Dalam penelitian ini, fokus penelitian ditujukan pada pengaruh curcumin pada peranannya menghambat faktor – faktor pro angiogenik. Curcumin memainkan peranan penting pada hampir seluruh faktor molekular yang mendukung vaskuloangiogenesis ( Yadav and aggarwal, 2011 ). Pada penelitian ini curcumin diteliti dalam pengaruhnya menghambat sirkulasi embrio. Berdasarkan hasil penelitian tersebut maka penelitian ini ingin membuktikan peran curcumin sebagai anti angiogenik dalam menghambat proses embriogenesis dan organogenesis dengan beberapa parameter sesuai tahapan

perkembangan hewan coba embrio ayam umur 48 jam yang dievaluasi adalah sirkulasi *yolk sac*, flexi cranial, neuropore anterior dan sistem optikus.

#### 6.1.1 Pengaruh Pemberian Curcumin terhadap Sirkulasi *Yolk sac*

Sistem sirkulasi merupakan bagian penting di awal fase pertumbuhan embrio. Seiring dengan berjalannya pertumbuhan embrio, kebutuhan oksigen dan nutrisi juga semakin meningkat. Perkembangan sirkulasi embrio akan mendukung tersedianya oksigen dan nutrisi ke seluruh jaringan embrio yang tidak dapat lagi difasilitasi melalui proses difusi. Titik awal dari semua proses tersebut adalah kondisi hipoksia yang merupakan kondisi ketika kebutuhan  $O_2$  dan nutrisi meningkat seiring dengan perkembangan embrio. Kondisi hipoksia akan mencetuskan ekspresi faktor molekuler yaitu *Hipoxia Inducible Factor 1-alfa (HIF1- $\alpha$ )* (Kelly *et al*, 2003). Keadaan hipoksia tersebut secara fisiologis memicu migrasi sel – sel hemangioblast yang membentuk *blood island* berdiferensiasi menjadi sel endotel dan memulai proses vaskulogenesis pada embrio.

Vaskulogenesis yang merupakan tahap awal dari sistem sirkulasi berlangsung terjadi baik intra maupun ekstraembrionik. *Yolk sac* ekstraembrionik, allantois dan plasenta adalah sumber vaskular dan lokasi *hematopoietic progenitor cell* yang akan menginisiasi proses vaskulogenesis. (Patel-Hett and D'Amore, 2011). Terbentuknya sirkulasi *yolk sac* merupakan pertanda proses vaskuloangiogenesis berjalan dengan baik. Perkembangan pembuluh darah pada *yolk sac* terbentuk dari pleksus vaskular yang terus mengalami *remodelling* dan sel – sel endotel yang mengalami proliferasi (Lucitti *et al*, 2007). Proses ini akan mendukung transportasi  $O_2$  dan nutrisi untuk kelangsungan hidup embrio (Walls *et al*, 2008).

Berdasarkan hasil penelitian ini, perlakuan injeksi curcumin menyebabkan penurunan presentasi sirkulasi *yolk sac* sesuai dosis perlakuan pada embrio ayam. Menurut uji statistik chi square penurunan tersebut signifikan ( $p < 0.05$ ). Hasil penelitian ini menunjukkan peranan curcumin sesuai dosis perlakuan memberikan pengaruh negatif pada pembentukan sirkulasi *yolk sac* dan bisa menjadi penyebab terjadinya kelainan pertumbuhan pada embrio hingga kegagalan pertumbuhan embrio. Pada tahap embrio ayam umur 48 jam, keadaan sirkulasi *yolk sac* adalah terbentuknya jaringan vaskular yang sudah terkoordinasi dengan baik dan berhubungan. Keberadaan sirkulasi *yolk sac* akan mendukung transportasi oksigen dan nutrisi untuk keberlangsungan hidup sel – sel embrio ( Le *et al*, 2004 ).

Secara garis besar, hasil penelitian efek curcumin pada sirkulasi *yolk sac* ini menunjukkan bahwa curcumin tidak menunjukkan pengaruh yang berarti pada kelompok A dan kelompok B dengan dosis 12,5  $\mu\text{M}$ . Namun Pengaruhnya pada kelompok C menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan dibandingkan dosis sebelumnya. Pada kelompok D perbedaannya pengaruhnya tidak terlalu besar terhadap dosis C. Curcumin memberikan pengaruhnya yang paling bermakna pada kelompok C dan D yang sebagian besar sampel ditandai dengan tidak adanya penampakan sinus terminalis sebagai tanda awal perkembangan sirkulasi *yolk sac*. Hal ini membuktikan bahwa curcumin pada batas dosis tertentu akan memperlihatkan pengaruhnya pada perkembangan vaskular dan pembentukan sirkulasi *yolk sac* pada embrio.

Pada penelitian ini, curcumin menunjukkan efek yang bermakna pada keberadaan sirkulasi *yolk sac*. Bila sirkulasi *yolk sac* tidak terbentuk sempurna dan sesuai tahapan yang ada maka kondisi ini dapat mengakibatkan



perkembangan sistem sirkulasi yang terhambat dan bisa berefek pada kelangsungan hidup embrio itu sendiri. Mekanisme penghambatan yang diakibatkan oleh curcumin diduga bekerja pada faktor – faktor molekular yang mendukung proses vaskuloangiogenesis. Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian Bae *et al*, yang menjelaskan bahwa curcumin menghambat kerja *HIF-1 $\alpha$* . *HIF-1 $\alpha$*  merupakan faktor molekular yang terekspresi pada kondisi hipoksia ketika sel – sel mengalami peningkatan kebutuhan O<sub>2</sub> dan nutrisi. Akibat yang ditimbulkan bisa berefek pada terbentuknya jaringan vaskular yang tidak sempurna dan tidak bisa menyeimbangkan akan kebutuhan embrio pada tahap tersebut. Hal ini dapat memberikan efek paling fatal untuk kelangsungan hidup embrio itu sendiri.

Proses vaskuloangiogenesis, tidak lepas dari peranan faktor – faktor molekular yang mendukung proliferasi sel, *remodelling* dan *sprouting* dari jaringan vaskular yang telah terbentuk. Adapun faktor – faktor tersebut adalah *VEGF*, *FGF*, *TGF- $\beta$* . *VEGF* merupakan faktor pertumbuhan utama yang mendukung proses vaskulogenesis (Patan, 2001). Faktor ini berperan pada hampir seluruh tahapan vaskuloangiogenesis di antaranya migrasi sel angioblas dari mesoderm dan diferensiasi menjadi sel endotel, *remodelling* vaskular serta sebagai faktor saat keadaan meningkatnya permintaan O<sub>2</sub> pada jaringan vaskular (Olsson *et al*, 2006).

Dalam penelitian pendukung lainnya curcumin juga dibuktikan bekerja sebagai anti- angiogenik berdasarkan aspek molekular. Didukung oleh penelitian Singh *et al* dengan menggunakan objek penelitian human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), curcumin berikatan dengan DNA dan menghambat proses sintesis HUVEC yang merupakan sumber utama asupan nutrisi dan O<sub>2</sub>

bagi calon embrio. Hasil lainnya menunjukkan bahwa curcumin mensupresi pertumbuhan *FGF* (Mohan *et al*, 2000). Telah diketahui bahwa *FGF* akan menstimulasi kerja dari MMP. Disini, curcumin sebagai anti angiogenik menunjukkan efeknya pada *FGF* signaling pathway dengan menghambat ekspresi MMP dan bisa berdampak pada proses sprouting dan remodelling sel endotel yang terhambat. Berdasarkan hal tersebut, nantinya bisa mempengaruhi sirkulasi baik ekstra maupun intraembrional termasuk sirkulasi *yolk sac*.

Adapun faktor molekular lainnya yang berkembang dalam pembentukan sirkulasi *yolk sac* adalah *TGF-β*. Peran dari *TGF-β* sendiri telah diuji pada berbagai penelitian. Hasil menunjukkan bahwa proses supresi dan delesi dari *TGF-β* menyebabkan kecacatan pada perkembangan sirkulasi *yolk sac* dan berakibat pada setengah penurunan presentasi hingga setengah dari kelangsungan hidup embrio tersebut. (Dickson *et al.*, 1995; Goumans and Mummery, 2000; Letterio *et al.*, 1994). Hal ini dikarenakan tahap awal sistem transportasi yang dihambat akan berakibat pada proses terbentuknya sirkulasi dan berujung pada retardasi perkembangan sistem kardiovaskular.

Berbagai penelitian telah membuktikan bahwa curcumin banyak berperan positif pada terapi tumor yang selama ini telah diuji dari sisi molekular dan sudah dikembangkan dalam berbagai bentuk suplementasi bagi manusia. Berdasarkan mekanisme kerjanya terhadap tumor, curcumin menunjukkan perannya sebagai zat anti angiogenik yang bisa berakibat pada tersupresinya faktor molekular sebagai modulator sinyal – sinyal pertumbuhan yang memvaskularisasi tumor tersebut (Vacca *et al*, 2000; Perry *et al*, 2010). Prinsip kinerja tersebut dihubungkan dengan pengaruhnya pada vaskularisasi embrio. Hambatan pada proses vaskulogenesis embrio yang berhubungan dengan diferensiasi, *sprouting*,

dan *remodelling* vaskular, akan berdampak pada embriogenesis dan organogenesis disebabkan oleh terhambatnya nutrisi dan O<sub>2</sub> yang ditransportasikan ke sel – sel embrio (Zwerts *et al*, 2007).

#### 6.1.2 Pengaruh Pemberian Curcumin terhadap Adanya Flexi Cranial dan pengaruhnya pada Organogenesis jantung

Flexi cranial diartikan sebagai keadaan menekuknya area kepala secara ventral dan ditandai dengan adanya tonjolan ventral dan pemanjangan area prosencephalon. ( Bellairs and Osmond, 2005 ) Flexi cranial merupakan salah satu kriteria pada skor total embrio. Berdasarkan kriteria klasifikasi tahap pertumbuhan embrio ayam menurut hamburger and hamilton, pada embrio ayam umur 48 jam sudah tampak *slight flexure* dari cranial yang melingkupi area forebrain. Adanya flexi cranial menandakan bahwa perkembangan otak khususnya forebrain berjalan sesuai tahap umur embrio. Pada tahap tersebut pula Sistem kardiovaskular baik jantung yang posisinya masi ada di regio kepala, dan pembuluh darah masih mengalami proliferasi dan perkembangan dari sel – sel pembentuknya (Memon, 2010). Apabila ada gangguan pada proses flexi tersebut maka kemungkinan disebabkan oleh faktor – faktor abnormalitas dari perkembangan sel – sel neural dan *cardiac* embrio tersebut.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa injeksi curcumin sesuai dosis perlakuan menyebabkan adanya hambatan pada proses flexi cranial embrio ayam umur 48 jam tersebut. Menurut data statistik, terjadi hambatan pada proses fleksi cranial dan menunjukkan hasil signifikan seiring dengan penambahan dosis curcumin ( $p=0.00$ ). Sama halnya pada hasil penelitian pada faktor sirkulasi *yolk sac*, hasil pengamatan pada proses flexi dari cranial embrio ayam umur 48 jam pada kelompok A yaitu kelompok control dan kelompok B sudah terdapat *slight flexure*

yang melingkupi area *forebrain*. Pada kelompok C ditemukan perubahan yang signifikan dari dosis sebelumnya yang hanya ditandai adanya indikasi flexi cranial yang berdampak pada terhambatnya proses flexi cranial embrio tersebut. Sedangkan pada dosis 50 $\mu$ M, terdapat beberapa sampel dengan tidak adanya indikasi flexi cranial.

Menurut penelitian Manner *et al* (1993) flexi cranial pada embrio menyebabkan kelainan pada proses perpindahan posisi jantung ke posisi yang lebih rendah dari kepala dan juga pada proses *cardiac looping*. Mekanisme hubungan tersebut adalah terbentuknya fleksi dari cranial hingga batas normalnya menentukan jarak yang normal penghubung antara vena dan arteri pada jantung. Apabila proses *cardiac looping* tidak berjalan semestinya maka jarak antara aliran masuk dan aliran keluar darah dari jantung juga abnormal. Pada akhirnya tahapan ini berakibat pada deformitas dari dinding jantung dan sekat-sekatnya.

Berbagai faktor pertumbuhan dan faktor transkripsi ikut terlibat pada proses perkembangan jantung. Faktor utama yang menginduksi perkembangan jantung adalah BMPs dan *FGF*. BMPs merupakan turunan dari *TGF- $\beta$*  yang berfungsi menginduksi terbentuknya kartilago dan tulang melalui proses diferensiasi chondroblast dan sel – sel osteoblast. BMPs berperan penting pada tahap awal induksi dari jantung, mengontrol perkembangan hingga proses akhir proses diferensiasi menjadi cardiomyocytes. Dalam berbagai riset *FGF* juga telah diuji perannya dalam proses seluler seperti migrasi sel, angiogenesis, diferensiasi pertahanan sel dan apoptosis. *FGF* dan BMP saling mendukung dalam memainkan peranan sebagai faktor molekular penginduksi sel – sel *cardiac* (Wagner and Siddiqui, 2007).

Dalam riset yang mendukung, curcumin sebagai zat anti angiogenik menghambat proses tersebut dalam berbagai jalur molekular termasuk penghambatan pada hampir keseluruhan faktor pertumbuhan dan transkripsi diantaranya jalur *FGF* dan *TGF- $\beta$* . Pengaruh curcumin pada penelitian ini, bila dihubungkan dengan faktor molekular yang dihambatnya maka akibat yang ditimbulkan adalah kecacatan pada vaskular embrio hingga bisa berakibat pada abnormalitas perkembangan jantung. Berdasarkan riset sebelumnya dan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa bila ada hambatan pada perkembangan jantung dan vaskular diduga berdampak pada terhambatnya proses flexi cranial embrio tersebut.

#### 6.1.3 Pengaruh Pemberian Curcumin terhadap Tertutupnya Neuropore Anterior

Neuropore anterior merupakan salah satu faktor dari skor total embrio yang dievaluasi. Point tersebut dinilai dari keadaan terbuka atau tertutupnya neuropore anterior. Evaluasi terhadap neuropore anterior berdasarkan kriteria hamburger hamilton pada tahap perkembangan embrio ayam umur 48 jam adalah keberadaan tertutupnya neuropore anterior yang mendasari pembentukan otak dan sistem saraf bagian rostral (Hamburger and Hamilton, 1951; Gilbert, 2000).

Pengamatan neuropore anterior embrio pada penelitian ini menunjukkan adanya kecenderungan untuk menurun sesuai dengan dosis perlakuan curcumin. Berdasar uji statistik menggunakan uji Chi square pun diketahui penurunan tersebut bermakna secara statistik ( $p < 0.05$ ). Berdasarkan hasil penelitian, terdapat perbedaan yang kurang signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok B dengan perlakuan injeksi curcumin 12,5  $\mu\text{M}$ . Sedangkan perubahan yang signifikan terlihat pada kelompok C dengan dosis injeksi 25 $\mu\text{M}$ . Pada pemberian dosis 50  $\mu\text{M}$  untuk kelompok D tidak ditemukan perbedaan

yang signifikan terhadap dosis sebelumnya yaitu pada kelompok C.. Berdasarkan hasil tersebut dapat diambil kesimpulan bahwa curcumin menunjukkan efek penghambatan pada dosis tertentu yaitu dosis 25  $\mu$ M pada proses perkembangan awal sistem saraf, khususnya pada penutupan neuropore anterior.

Perkembangan sistem saraf pada awal perkembangan embrio tidak lepas dari pengaruh sistem vaskular. (Zwerts *et al*, 2007) Jaringan dari pembuluh darah terus berkembang dan sangat berperan dalam memenuhi kebutuhan hidup sel pada perkembangan organ embrio (Cleaver and Melton, 2003; Nikolova and Lammert, 2003; Mizugishi *et al*, 2005). Pada proses penutupan neuropore anterior sangat erat kaitannya dengan proses pembentukan *neural tube* yang didukung perkembangan sel – sel neural. Pada perkembangan otak dan *neural tube* dibutuhkan pembuluh darah yang menginduksi proliferasi, migrasi dan diferensiasi *angioblast* dan sel endothelial dari *presomitic mesoderm* dan *lateral plate mesoderm*. (Pardanaud and Dieterlen-Lievre, 1993; Wilting *et al*, 1995; Klessinger and Christ, 1996; Kurz *et al*, 1996; Pardanaud *et al*, 1996; Ambler *et al*, 2001; Hogan *et al*, 2004). Berdasarkan penelitian Zwerts *et al* menjelaskan hubungan sistem vaskular dengan terjadinya abnormalitas pada *neural tube* embrio. Hasil penelitian menunjukkan inaktivasi dari sel – sel endothel menyebabkan perdarahan embrio, abnormalitas pada jantung dan penutupan *neural tube* (Zwerts *et al*, 2007). Berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan bahwa terhambatnya perkembangan sistem vaskular juga berhubungan erat dengan penutupan *neural tube*.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Hogan *et al*, proses vaskularisasi dalam perkembangan *neural tube* embrio tikus tergantung dari proses sprouting

dari *Peri-Neural Vascular Plexus (PNVP)* yang mengelilingi *neural tube*. Berdasarkan tingkat molekular dari penelitian sebelumnya, faktor – faktor saling berhubungan dan bekerja sinergis dalam mendukung proses vaskularisasi neural tersebut (Hogan *et al* 2004). Seperti uraian pada pembahasan sebelumnya, Nutrisi dan O<sub>2</sub> untuk pertumbuhan sel – sel embrio dimediasi oleh sarana sistem vaskular yang berjalan dengan baik. Begitu pula pada sel – sel neural yang membentuk *neural tube*. Hubungan tersebut dapat ditinjau berdasarkan aspek molekularnya. Faktor penting yang mendukung proses ini adalah *VEGF* yang berperan pula secara spesifik dalam penutupan *neural tube* khususnya pada keadaan peningkatan oksigen yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel – sel pada penutupan *neural tube*. *VEGF* juga terekspresi pada motor neuron dan daerah sekitarnya yang mendukung proses *sprouting* dari PNVP untuk mendukung sistem transportasi O<sub>2</sub> dan nutrisi sel–sel neural (James *et al*, 2006).

Penghambatan proses vaskuloangiogenesis yang disebabkan oleh pengaruh curcumin diduga tidak hanya berdampak pada sistem vaskular tetapi juga pada seluruh mekanisme yang mendukung perkembangan sistem tubuh lainnya yang ter-vaskularisasi. Dalam berbagai penelitian pada sel – sel neural, curcumin diteliti memiliki peran neuroprotektif termasuk mendukung proses neurogenesis (Dong *et al*, 2012).

Namun Pengaruh curcumin pada perkembangan neural masih perlu diuji untuk memastikan peranannya sebagai faktor pendukung atau penghambat. Berdasarkan penelitian Kim *et al*, melalui uji pada *Neuro Progenitor Cell (NPC)*, curcumin mendukung proliferasi pada dosis rendah yaitu 500nM. Sedangkan pada dosis di atas 10 µM. curcumin menunjukkan efeknya dalam menghambat proliferasi *NPC*. Berdasarkan hasil penelitian tersebut dapat dikaitkan dengan

hasil penelitian ini untuk mengetahui pengaruh curcumin dalam penutupan neuropore anterior yang membutuhkan kinerja dari sel – sel neural ditunjukkan terutama pada kelompok C 25  $\mu\text{M}$  terjadi penurunan persentasi tertutupnya neuropore anterior yang signifikan. Hal ini diduga pengaruh curcumin pada embrio adalah dapat menghambat baik melalui supresi pada sistem vaskular maupun neural (Kim *et al*, 2008).

#### 6.1.4 Pengaruh Pemberian Curcumin terhadap Keberadaan Sistem Optikus

Sistem optikus diawali dari interaksi dan koordinasi antara neuroepitelium, permukaan ektoderm dan mesenkim ekstraokular yang bersumber dari *neural crest* dan mesoderm. Keberadaan sistem optikus diawali dari perkembangan 2 sulkus optikus yang muncul pada *neural folds* regio forebrain (Sadler TW, 1995). Pembentukan area mata bersumber dari neuroepitelium dari bagian ventral *forebrain* yang mengalami evaginasi dan memanjang melalui mesenkim menuju permukaan ektoderm.. Proses tersebut terjadi ketika *neural fold* mulai untuk menutup pada minggu ketiga perkembangan embrio. *Neural fold* mengalami fusi sehingga terjadi proses evaginasi dari sulkus optikus. Perkembangan tersebut menginisiasi perkembangan *bilateral optic vesicle*.

Penelitian pada embrio ayam umur 48 jam ini, sistem optikus yang diamati adalah pada pembentukan *optic vesicle*. Sama halnya dengan hasil penelitian pada pengamatan terhadap Sirkulasi *yolk sac*, flexi cranial dan neuropore anterior, Pada pengamatan terhadap perkembangan sistem optikus, curcumin menunjukkan pengaruh hambatannya yang signifikan pada dosis 25 $\mu\text{M}$ . Tidak terdapat perubahan yang bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok B dengan dosis 12.5  $\mu\text{M}$ . Begitu juga pengaruh yang dihasilkan pada kelompok D



dengan dosis injeksi 50  $\mu$ M dan Kelompok C tidak terdapat perubahan yang bermakna.

Proses evaginasi *optic vesicle* juga diiringi dengan perkembangan vaskular primer yang bersumber dari *perineural vascular plexus* yaitu *choroidal vascular*. Proses vaskularisasi tersebut akan menutrisi dan menyalurkan  $O_2$  dalam mendukung pertumbuhan *optic vesicle* (Geniez, 2006). Dalam pertumbuhan *choroidal vascular* juga didukung oleh berbagai faktor molekular seperti *basic fibroblast growth factor (bFGF)* dan *vascular endothelial growth factor (VEGF)*. Sama halnya dengan proses vaskuloangiogenesis di tiap pertumbuhan embrio, faktor molekular yang mendukung proses tersebut berfungsi dalam proses *remodelling* dan *sprouting* pembuluh darah (Gogat et al, 2004; Marneros 2005).

Curcumin memberikan pengaruh dalam menghambat perkembangan vaskular beserta faktor molekular seperti faktor pertumbuhan dan transkripsi untuk sel – sel endotel tersebut. Begitu juga pada vaskularisasi sistem optikus tersebut. Perkembangan sistem optikus yang bersumber dari sel- sel neural ektoderm dari area forebrain saling berhubungan bila terdapat hambatan pada salah satu proses perkembangan tersebut. Pada penelitian dengan hewan coba embrio tikus, pengaruh teratogenik pada proses gastrulasi menunjukkan hambatannya pada perkembangan sistem optikus. Penelitian yang mendukung hubungan tersebut juga ditemukan pada manusia umur kehamilan 3 minggu yang setara dengan pertumbuhan embrio ayam umur 48 jam, pengaruh ethanol menunjukkan kerusakan primer pada area forebrain dan kemudian meluas pada abnormalitas sistem optikus yaitu *microphthalmia*, *anterior segment dysgenesis (Peters' anomaly)*, *iris dan optic nerve colobomas*, and *persistent hyperplastic*

*primary vitreous* (Cook C, 1995). Pengaruh zat tersebut juga dihubungkan dengan pengaruh curcumin pada penelitian ini. Curcumin diduga menghambat perkembangan sistem optikus melalui menghambat sel-sel neural ektoderm sebagai sumber perkembangan sistem optikus. Selain itu curcumin diduga berperan dalam mensupresi faktor – faktor pertumbuhan yang menutrisi vaskularisasi sistem optikus.

#### 6.1.5 Pengaruh Pemberian Curcumin terhadap Skor total Embrio

Skor total embrio pada penelitian ini yang terdiri dari sirkulasi *yolk sac*, flexi cranial, neuropore anterior dan sistem optikus merupakan modifikasi oleh penelitian Drake *et al*. Peneliti tidak menggunakan seluruh kriteria skor pada penelitian Drake *et al* disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya perbedaan pengecatan dan juga berdasarkan pada hasil akhir embrio yang diamati. Skor total embrio menggambarkan hasil pengamatan makroskopis terhadap sistem saraf, sistem optikus dan sirkulasi yang bisa diamati pada embrio ayam umur 48 jam dengan pengecatan imunohistokimia.

Berdasarkan uji statistik One Way- ANOVA, hasil menunjukkan bahwa pengaruh curcumin pada skor total embrio bermakna secara statistik sesuai peningkatan dosis dengan  $p < 0.05$ . Hasil ini didukung dari masing – masing analisis statistik point yang terdapat dalam skor total embrio bahwa dapat dibuktikan curcumin berpengaruh dengan hasil statistik bermakna terhadap proses organogenesis dan morfogenesis pada embrio ayam umur 48 jam. Keterkaitan sistem vaskular yang menopang proses pertumbuhan dan perkembangan sistem lainnya pada embrio dapat menghasilkan kesimpulan bahwa gangguan yang terjadi pada sistem vaskular diduga berdampak pula pada sistem lainnya. Hal ini disebabkan fungsi vaskular sebagai sistem transportasi

utama dalam mengangkut O<sub>2</sub> dan nutrisi yang mendukung pertumbuhan dan perkembangan setiap sistem lainnya.

## 6.2 Implikasi Terhadap Bidang Kedokteran

Curcumin merupakan zat dari bahan alam yang banyak terkandung di dalam kunyit ( *Curcuma longa* ). Sejak zaman dahulu, curcumin sendiri telah banyak dimanfaatkan dalam berbagai kehidupan manusia, seperti dalam bidang kuliner, kosmetik hingga untuk keperluan medis. Dalam bidang kedokteran sendiri, curcumin telah banyak dimanfaatkan sebagai suplementasi, pengobatan berbagai penyakit seperti malaria, sakit perut, cacingan, penyembuhan luka dsb. Curcumin pun telah lama dikenal sebagai antioksidan, anti angiogenik, anti virus, anti bakteri, ( Aggarwal *et al*, 2006 ) antiinflamasi dan penelitian yang marak beberapa tahun ini adalah efeknya sebagai pensupresi sel –sel kanker. Pertumbuhan kanker merupakan proses pertumbuhan abnormal dari sel – sel tubuh dikarenakan berbagai faktor seperti genetik, makanan dan lingkungan.

Mekanisme kerja curcumin sebagai anti angiogenik dihubungkan dalam mekanisme pertumbuhan kanker. Berbagai riset telah membuktikan bahwa curcumin merupakan zat anti angiogenik yang bekerja melalui jalur molekular dalam menghambat pertumbuhan yang mendukung perkembangan vaskular. Curcumin juga banyak diteliti dalam pengaruhnya mensupresi pertumbuhan sel – sel kanker melalui mekanismenya sebagai anti angiogenik. Curcumin bekerja dalam mensupresi faktor molekular seperti jalur *VEGF*, *HIF*, *FGF*, *TGF-β*, angiopietin-1 dan berbagai faktor pendukung proses angiogenesis yang memvaskularisasi sel – sel kanker. Proses vaskularisasi pada sel – sel kanker memiliki mekanisme yang hampir sama dengan embrio. Sedangkan penelitian mengenai pengaruh curcumin pada embrio masih terbatas. Kebanyakan

penelitian membahas pengaruh curcumin sebatas menyebabkan kematian sel – sel embrio, namun kurang menjelaskan mekanisme kerja curcumin serta dampak ke abnormalitas yang terjadi pada embrio. Selain itu akibat yang ditimbulkan pun kurang bisa digeneralisasi terhadap pengaruhnya ke manusia.

Pada manusia sendiri, belum ada penelitian mengenai pengaruh konsumsi curcumin pada ibu hamil. Selain itu penelitian mengenai efek toksisitas dan teratologis dari curcumin juga masih terbatas. Ibu hamil rentan terhadap pengaruh dari lingkungan dan dapat berakibat pada perkembangan embrio. Konsumsi curcumin dalam berbagai bentuk sediaan bisa jadi mempengaruhi baik kondisi ibu hamil maupun calon bayi. Pada penelitian ini, curcumin diketahui dapat mempengaruhi kelainan pada proses organogenesis melalui penghambatan proses vaskulo-angiogenesis yang memfasilitasi proses tersebut. Maka, Pengaruh curcumin dalam penelitian ini bisa berdampak pada kelainan kongenital yang terjadi pada bayi, hingga kematian janin. Oleh karena itu, Peneliti menganjurkan untuk mengurangi konsumsi berlebih dari curcumin dalam keadaan hamil, disebabkan oleh pengaruh curcumin yang bisa menjadi penyebab dalam kelainan janin baik dalam sistem kardiovaskular dan sistem lainnya yang bergantung pada sistem kardiovaskular.

### **6.3 Keterbatasan Penelitian**

Penelitian dengan menggunakan embrio ayam ini menggunakan metode *randomized control group post test design* dengan eksperimental murni ini bertujuan untuk mengamati morfologis dan struktur anatomis embrio pada umur 48 jam. Penelitian ini menggunakan sampel sesuai rumus Steell dan Torrie dengan jumlah sampel minimal masing – masing 7 butir telur ayam. Berdasarkan kepada penelitian yang telah terlaksana, peneliti menemukan berbagai hambatan

yang diharapkan dapat dievaluasi dan menjadi bahan pertimbangan dalam melakukan penelitian yang serupa atau penelitian lanjutan untuk ke depannya.

Lokasi merupakan salah satu hambatan dalam penelitian ini. Hal ini disebabkan oleh lokasi pembelian telur dan lokasi inkubasi telur tergolong jauh sehingga kemungkinan untuk telur bertumbuh walaupun ditempatkan di bawah suhu ruang dapat terjadi. Selain itu masing – masing telur juga diduga tidak bersumber dari satu individu sehingga kemungkinan untuk pertumbuhan embrio yang tidak sama terjadi dalam penelitian ini. Namun perbedaan anatomi dan morfologi yang diamati menurut tabel scoring embrio Drake *et al.* ( 2006 ) menunjukkan hasil yang bermakna sehingga perbedaan tersebut bisa diabaikan.

Dalam penelitian ini, pengamatan anatomi dan morfologi embrio ayam umur 48 jam dilakukan setelah pengecatan imunohistokimia. Penelitian imunohistokimia sendiri dilaksanakan selama 2 hari. Namun dalam proses pengecatan tersebut dapat terjadi perubahan struktur morfologis dan anatomi yang membuat evaluasi kurang maksimal. Hal ini disebabkan karena sebagian besar *point* skor seperti neuropore anterior, flexi cranial dan sistem optikus untuk pengamatan struktur morfologis dan anatomi tidak dapat dievaluasi dengan maksimal sebelum pengecatan. Oleh karena itu, diperlukan penelitian dengan menggunakan metode lain yang lebih sesuai untuk pengamatan anatomis dan morfologis embrio.

Keterbatasan lainnya dalam penelitian ini adalah hasil penelitian yang menunjukkan pengaruh curcumin pada proses organogenesis embrio ayam belum bisa digeneralisasikan kepada embrio manusia ditinjau dari aspek dosis yang digunakan. Faktor induk merupakan faktor yang paling berperan dalam proses ini. Pada penelitian ini dengan menggunakan embrio ayam, paparan curcumin

langsung ditujukan pada embrio. Sedangkan pada manusia, diduga terdapat intervensi dari ibu yang bisa menimbulkan pengaruh pada proses farmakokinetik dari curcumin terhadap embrio.



## BAB VII

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

1. Curcumin menyebabkan gangguan pada sirkulasi *yolk sac* embrio ayam melalui pengaruhnya terhadap retardasi perkembangan pembuluh darah.
2. Curcumin menyebabkan gangguan pada perkembangan jantung dan otak pada embrio yang ditandai dengan retardasi bentuk flexi cranial yang tidak sesuai dengan perkembangan usia.
3. Curcumin menyebabkan gangguan pada perkembangan persarafan dan calon sistem pengelihatian yang ditandai dengan tetap terbukanya neuropore anterior dan tidak adanya sistem optikus pada embrio yang diberi perlakuan.
4. Dosis batas curcumin yang memberikan efek signifikan yaitu pada konsentrasi 25  $\mu\text{M}$ .

#### 7.2 Saran

Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai jumlah curcumin yang aman di konsumsi oleh ibu hamil

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K dan Lichtman AH. 2003. *Cellular and Molecular Immunology*. 6th edition. Philadelphia: Elsevier Science, 516.
- Abdulla, Blew, A., Holterman, J.. 2004. Cardiovascular Embryology. *Pediatr Cardiol*, 25:191–200.
- Adams, Ralf H. and Alitalo, Kari. 2007. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. [www.nature.com/reviews/molcellbio](http://www.nature.com/reviews/molcellbio).
- Altshuler, Kara., Berg, Michael., Frazier, Linda M *et al.* 2003. Critical Periods in Development. Paper. University of Kansas School of Medicine- Wichita
- Ambler, C. A., Nowicki, J. L., Burke, A. C. and Bautch, V. L. 2001. Assembly of trunk and limb blood vessels involves extensive migration and vasculogenesis of somite-derived angioblasts. *Dev. Biol.* 234, 352-364.
- Arun N, Nalini N. 2002. Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. *Plant Foods Hum Nutr*, 57, 41-52.
- Babu KS, Srinivasan K. 1997. Hypolipidemic action of curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in streptozotocin induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem*, 166, 169-75.
- Bae MK, Kim SH, Jeong JW, Lee YM, Kim HS, Kim SR, *et al.* 2006 Curcumin inhibits hypoxia-induced angiogenesis via downregulation of *HIF-1*. *Oncol Rep*, 15: 1557-62.
- Bellairs, Ruth., Osmond, Mark. 2005. *The Atlas of Chick Development*, 2<sup>th</sup> Ed., Elsevier Academic Press, California, p. 39 – 40.
- Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, Ten Dijke P. 2005. Transforming Growth Factor-Beta Signal Transduction In Angiogenesis And Vascular Disorders. *Chest*, 128(6 Suppl):585S-590S.
- Bie, Guus van der, 2001. *Early Development from A Phenomenological Point of View*. Louis Bolk Instituut, NL-3972 LA Driebergen, Amsterdam.
- Boot MJ, Gitten berger-DeGroot, Van Iperen L, Hierck BP, Poelmann RE. 2003. Spatio temporally separated cardiac neural crest subpopulations that target the outflow tract septum and pharyngeal arch arteries. *Anat Rec* 275A: 1009–1018.
- Brook FA, Shum AS, Van Straaten HW, Copp AJ. 1991. Curvature of the caudal region is responsible for failure of *neural tube* closure in the curly tail (ct) mouse embryo. *Development*, 113:671–8.



- Chaiworapongsa, Tinnakorn., Romero, Roberto., Kusanovic, J.P, *et al.* 2010. Unexplained Fetal Death is Associated with Increased Concentrations of Anti angiogenic Factors in Amniotic Fluid. *J Matern Neonatal Med*, 23(8): 794-805.
- Chandru H and Sharada A.C. 2007. Anti angiogenic Effects of Synthetic Analogs of Curcumin *in vivo*. *I. African Journal of Biomedical Research*, Vol. 10: 241 - 248
- Chen, Chia-Chi., Hsieh, Ming-Shu., Hsuuw, Yan-Der., Huang, Fu-Jen., and Chan, Wen- Hsiung. 2010. Hazardous Effects of Curcumin on Mouse Embryonic Development through a Mitochondria-Dependent Apoptotic Signaling Pathway, *Int. J. Mol. Sci*,11:2839-2855
- Chen CC, Chan WH. 2012. Injurious Effects Of Curcumin On Maturation Of Mouse Oocytes, Fertilization And Fetal Development Via Apoptosis. *Int J Mol Sci*. 13(4):4655-72.
- Cleaver O. and Melton D.A. 2003. Endothelial signalling during development. *Nat Med*, 9: 661-668.
- Cook C. 1995. Embryogenesis of congenital eye malformations. *Vet Comp Ophthalmol* 5:109.
- Copp AJ, Brook FA, Roberts HJ. 1988. A cell-type-specific abnormality of cell proliferation in mutant (curly tail) mouse embryos developing spinal *neural tube* defects. *Development*, 104:285–95.
- Coultas L., Chawengsaksophak K. and Rossant J. 2005. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature*, 438: 937-945.
- Cox,C.M., Poole, T.J. 2000. Angioblast Differentiation is Influenced by The Local Environment: FGF-2 Induces Angioblast and Patterns Vessel Formation in The Quail Embryo. *Dev.Dyn*, 218: 371 – 382.
- Crivellato, Enrico. 2011. The role of angiogenic growth factors in organogenesis, *Int. J. Dev. Biol*, 55 : 365 - 375
- Dahlan MS. 2004. Statistika untuk Kedokteran dan Kesehatan. Cetakan 1. PT. Arkans: Jakarta.
- Dickson, M.C., Martin, J.S., Cousins, F.M., Kulkarni, A.B., Karlsson, S. and Akhurst, R.J. 1995. Defective Haematopoiesis and Vasculogenesis in Transforming Growth Factor-Beta 1 Knock Out Mice. *Development*, 121: 1845-1854.
- Dong, Suzhen., Zeng, Qingwen., Mitchell, E.Siobhan., *et al.* 2012. Curcumin Enhances Neurogenesis and Cognition in Aged Rats : Implications For Transcriptional Interactions Related To Growth and Synaptic plasticity.

*Plos One*, 7(2) : e31211.

Drake, Victoria J., Koprowski, Stacy L., Lough, John W., Smith, Susan M. 2006. Gastrulating Chick Embryo as a Model for Evaluating Teratogenicity : A Comparison of Three Approaches. *Birth Defects Research (PartA): Clinical and Molecular Teratology*, 76:66–71.

Dvorak, Petr and Hampl, Ales. 2005. Basic fibroblast growth factor and its receptors in human embryonic stem cells. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, (43) 4, 2005: 203-208.

Edwards *et al.* 2011. Expression of angiogenic Basic Fibroblast Growth Factor Platelet Derived Growth Factor, Thrombospondin-1 and Their Receptor the Porcine Maternal-Fetal Interface. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9:5

Estibeiro JP, Brook FA, Copp AJ. 1993. Interaction between splotch (Sp) and curly tail (ct) mouse mutants in the embryonic development of *neural tube* defects. *Development*, 119:113–21.

Fasenko, G.M. 2007. Egg Storage and The Embryo. *Poult. Sci. May*, 86(5): 1020-1024.

Ferguson, JE., Kelley, RW., dan Patterson, C. 2005. Mechanisms of Endothelial Differentiation in Embryonic Vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25:2246-2254.

Fretts RC. 2005. Etiology and Prevention of Stillbirth. *Am J Obstet Gynecol*, 193:1923 –1935.

Gavard, Julie and Gutkind, J. Silvio. 2006. VEGF controls Endothelial-Cell Permeability by Promoting The  $\beta$ -arrestin-Dependent Endocytosis of VE-Cadherin. *Nature Cell Biology*, 8: 1223 - 1234 .

Gilbert, SF. 2000. 12: Formation of the *Neural tube*. *Developmental Biology* (6 ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates. ISBN 978-0-87893-243-6. Retrieved 30 November 2011.

Gilbert-barness, enid., debich-spicer, diane and Optiz, John M. 2004. *Embryo and Fetal Pathology*. The Press Syndicate of The University of Cambridge. Port Melbourne VIC 3207, Australia.

Gogat K, Le Gat L, Van Den Berghe L, et al. VEGF and KDR gene expression during human embryonic and fetal eye development. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45:7–14.

Goumans, M.J. and Mummery, C. 2000. Functional Analysis of The TGFbeta Receptor/Smad Pathway Through Gene Ablation in Mice. *Int J Dev Biol* 44: 253-265.

Hamburger, V., and H. L. Hamilton. 1951. A series of Normal Stages in The Development of The Chick Embryo. *J. Morphol*, 88:49-92.

Hiratsuka, S., *et al.* 2005. Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) Is Involved in Guidance of VEGF Receptor-Positive Cells to the Anterior Portion of Early Embryos. *Molecular and Cellular Biology*, 25(1): 355-363.

Heron MP, Hoyert DL, Murphy SL, Xu JQ, Kochanek KD, Tejada-Vera B.2009. Deaths: Final data for 2006. National vital statistic reports; vol 57 no 14. Hyattsville, MD : National Center for Health Statistics

Hogan, K.A., Ambler, C.A., Chapman, D.L. & Bautch, V.L. 2004. The Neural Tube patterns vessels developmentally using the VEGF signaling pathway. *Development* 131, 1503–1513.

Hsuuw YD, Chang CK, Chan WH, Yu JS. 2005. Curcumin Prevents Methylglyoxal-Induced Oxidative Stress And Apoptosis In Mouse Embryonic Stem Cells And Blastocysts. *J Cell Physiol*, 205(3):379-86.

Huang MT, Lou YR, Ma W, *et al.* 1994. Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach, duodenal, and colon carcinogenesis in mice. *Cancer Res*, 54: 5841-7.

James, Jennifer M., Gewolb, Cara and Bautch, Victoria L. 2006. Neurovascular development uses VEGF-A signaling to regulate blood vessel ingression into the neural tube. *Development*, 136: 833-841.

Joe, B., Vijaykumar, M. and Lokesh, B.R. 2004. Biological Properties of Curcumin :Celular and Molecular Mechanism of Action. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 44: 97 – 111.

Karoline, Lipnik. 2008. Vascular stem cells and progenitor. Basic seminar 1, Department of vascular biology and thrombosis research. Medical university of Vienna, Austria, 16 Juni.

Kiernan JA.2008. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. 4th ed. Bloxham, UK: Scion.

Kelly, B.D., Hackett, S.F., Hirota, K. 2003. Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ Res*, 93: 1074-1081.

Klessinger, S. and Christ, B. (1996). Axial structures control laterality in the distribution pattern of endothelial cells. *Anat. Embryol.* 193, 319-330.

Kunchandy E, Rao MNA. 1990. Oxygen radical scavenging activity of curcumin.

*Int J Pharmacol*, 58: 237-40.

Kim, So Jung., Son, Tae Gen., Park, Hee Ra, *et al.* 2008. Curcumin Stimulates Proliferation of Embryonic Neural Progenitor Cells and Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *J Biol Chem.* 283(21): 14497–14505.

Kurz, H., Gartner, T., Egli, P. S. and Christ, B. (1996). First blood vessels in the avian *neural tube* are formed by a combination of dorsal angioblast immigration and ventral sprouting of endothelial cells. *Dev. Biol.* 173, 133-147.

Le Noble F, Moyon D, Pardanaud L, Yuan L, Djonov V, *et al.* 2004. Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo *yolk sac*. *Development*, 131: 361–375.

Letterio, J.J., Geiser, A.G., Kulkarni, A.B., Roche, N.S., Sporn, M.B. and Roberts, A.B. 1994. Maternal Rescue of Transforming Growth Factor-Beta 1 Null Mice. *Science*, 264: 1936-1938.

Li L, Braithe F.S, Kurzrock R.2005. Liposome-encapsulated curcumin: in vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis. *Cancer*, 104, 132231.

Liewellyn BD.2009. Nuclear staining with alum-hematoxylin. *Biotech. Histochem.* 84: 159-177.

Lin YG, Kunnumakkara AB, Nair A, *et al* (2007).Curcumin inhibits tumour growth and angiogenesis in ovarian carcinoma by targeting the nuclear factor-kappaB pathway. *Clin Cancer Res*, 13, 3423-30.

Liu, Dong., Schwimer, Joshua., Liu, Zhijun., Eugene, A., Woltering and Frank, L. Greenway. 2008. Anti angiogenic Effect of Curcumin in Pure Versus in Extract Forms. *Pharmaceutical Biology*, Vol. 46: 677–682.

Lucitti JL, Jones EAV, Huang CQ, Chen J, Fraser SE, *et al.* 2007. Vascular remodeling of the mouse *yolk sac* requires hemodynamic force. *Development* 134: 3317–3326.

Marneros AG, Fan J, Yokoyama Y, *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor Expression In The Retinal Pigment Epithelium Is Essential For Choriocapillaris Development And Visual Function. *Am J Pathol.* 2005;167:1451–1459.

Memon, Samreen. 2010. Cardiac Birth Defects Caused By Lifestyle And Their Potential Prevention By Nutritional Molecules. Thesis. University of Nottingham.

Mohan R, Sivak J, Ashton P, Russo LA, Pham BQ, Kasahara N, *et al.* 2000.

Curcuminoids inhibit the angiogenic response stimulated by fibroblast growth factor-2, including expression of matrix metalloproteinase gelatinase B. *J Biol Chem*, 275:10405-12.

Nikolova, G. And E. Lammert. 2004. Interdependent Development of Blood Vessels and Organs. *Cell Tissue Res.*, 314 : 33 – 42.

Oklu, Rahmi., Walker, Thomas G., Wicky, Stephan., Hesketh, Robin. 2010. Angiogenesis and Current Anti angiogenic Strategies for The Treatment of Cancer. *J Vasc Interv Radiol*, 21:1791–1805.

Oyagbemi, Ademola A., Saba, Adebowale B., Ibraheem, Azeez O. 2010. Prevention Curcumin: From Food Spice to Cancer Prevention. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 10: 963-967.

Olsson, Anna-Karin., Dimberg, Anna., Kreuger, Johan., Claesson-Welsh, Lena. 2006. VEGF receptor signalling — in control of vascular function. *Nature, molecular cell biology*, (7): 359 - 371.

O'Rahilly, R. 1979. Early Human Development and The Chief Sources of Information on Staged Human Embryos. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Biol*, 9(4);273- 80.

O'Rahilly, Ronan and Muller, Fabiola. 1987. Developmental Stages in Human Embryos : Including a Revision of Streeter "Horizons" and a Survey of the Carnegie Collection (Washington,D.C)

Padmanabhan R. 2006 Etiology, pathogenesis and prevention of *neural tube* defects. *Congenit Anom (Kyoto)*, 46:55–67.

Papetti, Michael., Herman, Ira M. 2002. Mechanisms of Normal and Tumor-derived Angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol May*, vol. 282 no. 5: C947-C970.

Pardanaud, L. and Dieterlen-Lievre, F.1993. Emergence of endothelial and hemopoietic cells in the avian embryo. *Anat. Embryol.* 187, 107-114.

Pardanaud, L., Luton, D., Prigent, M., Bourcheix, L.-M., Catala, M. and Dieterlen-Lievre, F. 1996. Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis. *Development* 122, 1363-1371.

Patan, Sybill. 2001. Vasculogenesis and Angiogenesis as Mechanisms of Vascular Network Formation, Growth and Remodeling. *Journal of Neuro-Oncology*, 50: 1-15.

Patel-Hett, Sunita., D'Amore, Patricia A. 2011. Signal Transduction in Vasculogenesis and Developmental Angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol*, 55: 353-363

- Perkins, Sarah., Verschoyle, Richard D., Hill, Kirsti., *et al.* 2002. Chemopreventive Efficacy and Pharmacokinetics of Curcumin in the Min/+ Mouse, a Model of Familial Adenomatous Polyposis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11 : 535 – 540.
- Pepper MS. 1997. Transforming Growth Factor-Beta: Vasculogenesis, Angiogenesis, And Vessel Wall Integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 8(1):21-43.
- Perry, Marie- Claude., Demeule, Michel., Re'gina, Anthony., Moumdjian, Robert., Be'liveau, Richard. 2010. Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in glioblastoma xenografts. *Mol. Nutr. Food Res*, 54: 1192–1201.
- Pudliszewski, Michel., Pardanaud, Luc. 2005. Vasculogenesis and angiogenesis in The Mouse Embryo Studied Using Quail/Mouse Chimeras. *Int. J. Dev. Biol.* Steel, R.G.D. dan J.H. Torrie. 1991 *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Penerjemah Bambang, S. PT Gramedia Pustaka utama Jakarta.
- Rahayu, Indriati Dwi. 2011. *Hambatan EGCG (Epigallocatechin-3-gallate) terhadap ekspresi VEGF dan VE- Cadherin dalam vaskulogenesis embrio ayam*. Thesis. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Rima Dardik, Joseph Loscalzo, Regina Eskaraev, Aida Inbal. 2005. Molecular Mechanisms Underlying the Pro angiogenic Effect of Factor XIII. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25: 526-532.
- Romero *et al*, 2010. An Imbalance Between angiogenic and Anti- angiogenic Factors Precedes Fetal death in a Subset of Patients : results of a longitudinal study. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 23(12):1384–1399.
- Sadler, TW. 1995. Langman's Medical Embryology. 7th edition. William & Wilkins. Baltimore.
- Shankar, Sharmila., Chen, Qinghe., Sarva, Krishna., Siddiqui, Imtiaz And Srivastava, Rakesh K. 2007. Curcumin Enhances The Apoptosis-Inducing Potential Of TRAIL In Prostate Cancer Cells: Molecular Mechanisms Of Apoptosis, Migration And Angiogenesis. *Journal Of Molecular Signaling* 2007, 2:10
- Sharma, R.A., McLelland, H.R., Hill, K.A., *et al.* 2001. Pharmacodynamic and Pharmacokinetic study of oral Curcuma Extract in Patients with Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*, 7 : 1894 – 1900.
- Sheng, Guojun. 2010. Primitive and definitive erythropoiesis in the *yolk sac*: a bird's eye view. *Int. J. Dev. Biol.* 54: 1033-1043

Shiau, Rong-jen., shih, pei chun., wen, yu-der., 2011. Effect of silymarin on curcumin induced mortality in Zebrafish( danio rerio ) embryos and larvae. *Indian journal of experimental Biology*, 49: 491 - 497.

Streeter,G.L. Developmental Horizons in Human Embryos: Description of Age Groups XIX, XX, XXI, XXII,and XXIII,"Prepared for Publication by C.H.Heuser,and G.W. CornerContributionsin *Embryology* (1951):165.

Takahashi, Hiroyuki and Shibuya, Masabumi. 2005. The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)/ VEGF Receptor System And Its Role Under Physiological And Pathological Conditions. *Clinical Science*, 109: 227–241.

Vacca, A., Ribatti, D., Pellegrino, A., Dammacco, F. 2000. Angiogenesis and anti-angiogenesis in human neoplasms. Recent developments and the therapeutic prospects]. *Ann.Ital. Med. Int.*, 15, 7–19.

Vijayalaxmi. 1980. Genetic Effect of Turmeric and Curcumin In Mice and Rats. *Mutation research*, 79(2): 125-132.

Wagner, Michael., Siddiqui, M.A.Q. 2007. Signal Transduction in Early Heart Development (I) : Cardiogenic Induction and Heart Tube Formation. *Exp Biol Med*, 232:852–865.

Walls, Johnathon R., Coultas, Leigh., Rossant, Janet., Henkelman, R Mark. 2008. Three-Dimensional Analysis of Vascular Development in the Mouse Embryo. *PLoS ONE* 3(8): e2853. doi:10.1371/journal.pone.0002853.

Wang Y and Zhao S. 2010. *Vascular Biology of the Placenta*. Morgan & Claypool Life Sciences San Rafael (CA). USA.

Wu, Xiaoping., Maa, Jing., Hanc, Jing-Dong., Wang, Nanping., Chena, Ye-Guang. 2006. Distinct Regulation of Gene Expression in Human Endothelial Cells by TGF and its Receptors. *Elsevier Microvascular Research*, 71: 12–19.

Wilting, J., Brand-Saberi, B., Huang, R., Zhi, Q., Kontges, G., Ordahl, C. P. and Christ, B. 1995. angiogenic potential of the avian somite. *Dev. Dyn.* 202,165-171.

Yadav, Vivek R. and Aggarwal, Bharat B. 2011. Curcumin A component of the golden spice, targets multiple angiogenic pathways. *Cancer Biology & Therapy*, 11(2): 236-241.

Zwerts, Femke., Lupu, Florea., De Vriese, Astrid., et al. 2007. Lack of endothelial cell survivin causes embryonic defects in angiogenesis, cardiogenesis, and neural tube closure. *The American Society of Hematology*, 109(11): 4742 – 4752.

LAMPIRAN 1

ALAT DAN BAHAN PENELITIAN



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Gambar 1 (a) bahan pengambilan embrio;(b)alat dan bahan injeksi;(c) inkubator;  
(d)alat bahan fiksasi embrio;(e)telur ayan;(f)alat bahan pengecatan  
imunohistokimia



LAMPIRAN 2  
DOKUMENTASI KEGIATAN



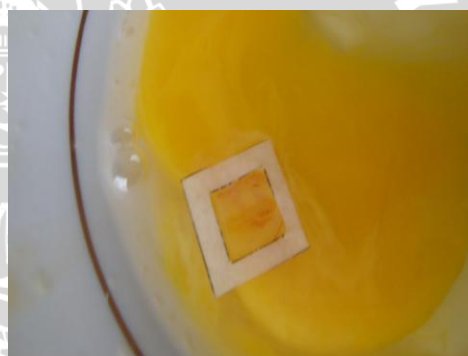
(a)



(b)



(c)



(d)

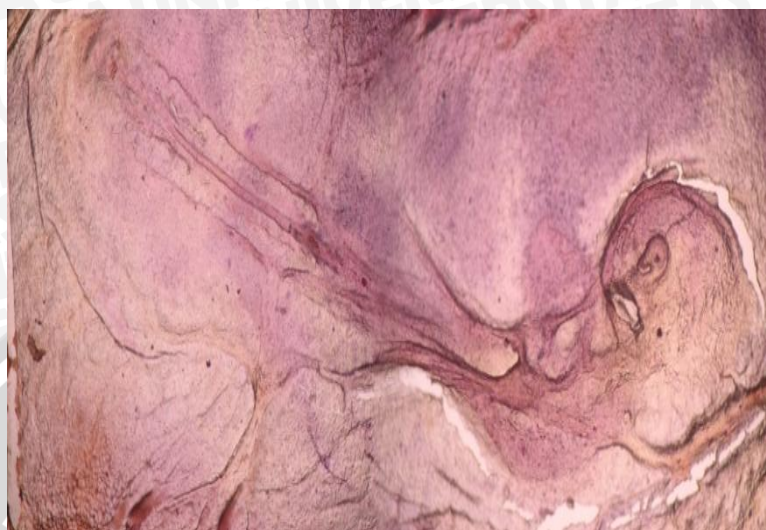


(e)



(f)

Gambar 2(a) Penimbangan curcumin; (b) Injeksi telur; (c) Inkubasi telur; (d) Pengambilan embrio dengan kertas saring; (e) Pengawetan; (f) Pengecatan imunohistokimia



Gambar 3. Embrio Ayam dengan Pengecatan Imunohistokimia



LAMPIRAN 3

DATA STATISTIK UJI CROSSTABS DENGAN ANALISIS CHI SQUARE PADA  
SIRKULASI YOLK SAC

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Sirkulasi * Jenis_Perlakuan	33	100.0%	0	.0%	33	100.0%

Sirkulasi \* Jenis\_Perlakuan Crosstabulation

Count

		Jenis_Perlakuan				Total
		Tanpa Perlakuan	Dengan Injeksi	Dengan Injeksi 2x	Dengan Injeksi 4x	
Sirkulasi	2	0	0	5	6	11
	3	7	4	1	2	14
	4	0	7	1	0	8
Total		7	11	7	8	33

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	31.622 <sup>a</sup>	6	.000
Likelihood Ratio	36.285	6	.000
Linear-by-Linear Association	9.453	1	.002
N of Valid Cases	33		



LAMPIRAN 4

DATA STATISTIK UJI CROSSTABS DENGAN ANALISIS CHI SQUARE PADA FLEXI CRANIAL

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Flexi_Cranial * Jenis_Perlakuan	33	100.0%	0	.0%	33	100.0%

Flexi\_Cranial \* Jenis\_Perlakuan Crosstabulation

Count

		Jenis_Perlakuan				Total
		Tanpa Perlakuan	Dengan Injeksi	Dengan Injeksi 2x	Dengan Injeksi 4x	
Flexi_Cranial	1	0	0	4	5	9
	2	0	4	2	3	9
	3	4	7	1	0	12
	4	3	0	0	0	3
Total		7	11	7	8	33

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	31.464 <sup>a</sup>	9	.000
Likelihood Ratio	37.494	9	.000
Linear-by-Linear Association	20.512	1	.000
N of Valid Cases	33		



LAMPIRAN 5

DATA STATISTIK UJI CROSSTABS DENGAN ANALISIS CHI SQUARE PADA NEUROPORE ANTERIOR

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Anterior_Neuropore * Jenis_Perlakuan	33	100.0%	0	.0%	33	100.0%

Anterior\_Neuropore \* Jenis\_Perlakuan Crosstabulation

Count

		Jenis_Perlakuan				Total
		Tanpa Perlakuan	Dengan Injeksi	Dengan Injeksi 2x	Dengan Injeksi 4x	
Anterior_Neuropore	2	0	0	3	6	9
	3	7	11	4	2	24
Total		7	11	7	8	33

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2- sided)
Pearson Chi-Square	16.795 <sup>a</sup>	3	.001
Likelihood Ratio	20.115	3	.000
Linear-by-Linear Association	14.463	1	.000
N of Valid Cases	33		



LAMPIRAN 6

DATA STATISTIK UJI CROSSTABS DENGAN ANALISIS CHI SQUARE PADA  
SISTEM OPTIKUS

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Sistem_Optikus * Jenis_Perlakuan	33	100.0%	0	.0%	33	100.0%

Sistem\_Optikus \* Jenis\_Perlakuan Crosstabulation

Count

		Jenis_Perlakuan				Total
		Tanpa Perlakuan	Dengan Injeksi	Dengan Injeksi 2x	Dengan Injeksi 4x	
Sistem_Optikus	0	0	1	4	5	10
	2	7	10	3	3	23
Total		7	11	7	8	33

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	11.701 <sup>a</sup>	3	.008
Likelihood Ratio	13.637	3	.003
Linear-by-Linear Association	10.055	1	.002
N of Valid Cases	33		



LAMPIRAN 7

DATA STATISTIK UJI ONE-WAY ANOVA PADA SKOR TOTAL EMBRIO

Descriptives

Skor\_Total

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Tanpa Perlakuan	7		
Dengan Injeksi	11	11.09	1.221	.368	10.27	11.91	8	12
Dengan Injeksi 2x	7	7.43	2.699	1.020	4.93	9.92	5	12
Dengan Injeksi 4x	8	6.63	1.188	.420	5.63	7.62	5	8
Total	33	9.30	2.616	.455	8.38	10.23	5	12

Test of Homogeneity of Variances

Skor\_Total

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.991	3	29	.003

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

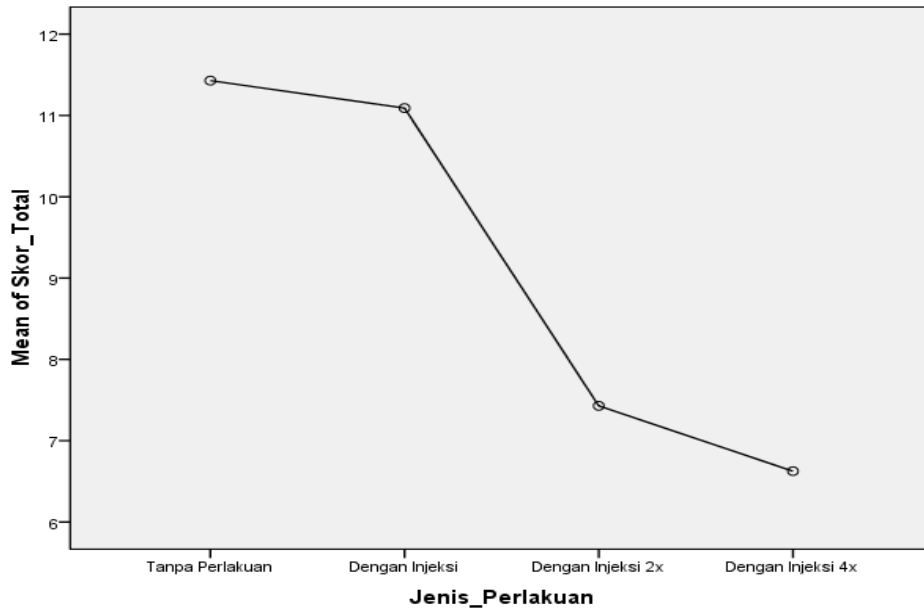
Skor\_Total

Tukey B<sup>a,b</sup>

Jenis_Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Dengan Injeksi 4x	8	6.63	
Dengan Injeksi 2x	7	7.43	
Dengan Injeksi	11		11.09
Tanpa Perlakuan	7		11.43



## Means Plots





**PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Estiani Kusumaningrum

NIM : 0910710069

Program Studi : Program Studi Kedokteran Umum  
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat di buktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, Jumat 11 September 2012

Yang membuat pernyataan,

(Estiani Kusumaningrum)

NIM. 0910710069