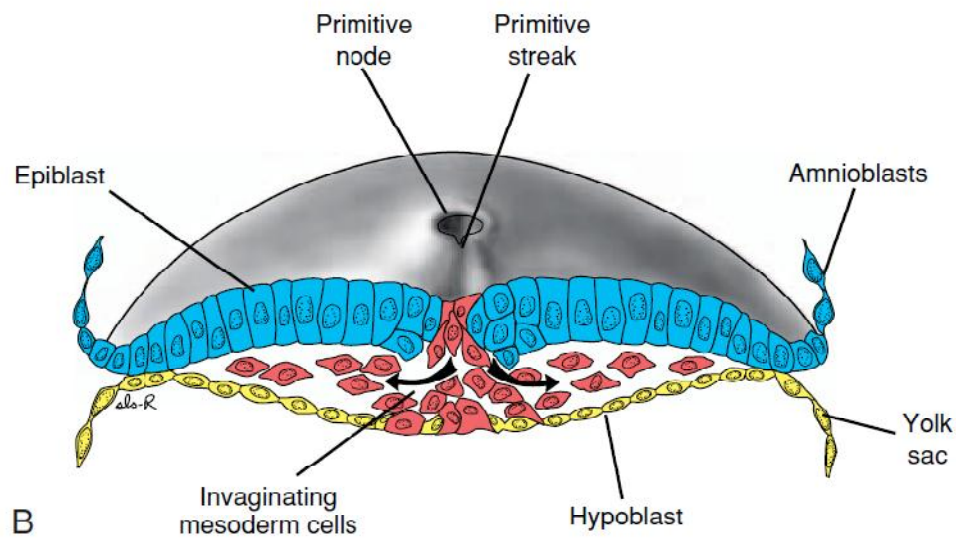


BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Gastrulasi Embrio

Peristiwa paling khas yang terjadi selama minggu ke-3 kehamilan adalah gastrulasi, proses yang menetapkan tiga *germ layers* (ektoderm, mesoderm, dan endoderm) di dalam embrio. Gastrulasi dimulai dengan pembentukan *streak* primitif di permukaan epiblas. Awalnya, garis tersebut samar-samar terlihat, tetapi dalam hari ke 15 - 16 perkembangan embrio, dapat terlihat sebagai alur sempit dengan sedikit tonjolan di kedua sisi. Ujung bagian kepala dari garis tersebut, nodus primitif, terdiri dari daerah yang sedikit lebih tinggi yang mengelilingi lubang primitif kecil. Sel-sel dari epiblas kemudian bermigrasi menuju garis primitif. Setibanya di wilayah ini, sel-sel dari epiblas menjadi berbentuk seperti labu, melepaskan diri dari epiblas tersebut, dan menyelip di bawahnya. Gerakan masuk ini dikenal sebagai invaginasi. Setelah sel mengalami invaginasi, beberapa menggantikan hipoblas, menciptakan endoderm embrio, dan sel-sel lain disusun di antara epiblast dan endoderm yang baru dibuat untuk membentuk mesoderm. Sel yang tersisa di epiblas kemudian membentuk ektoderm. Dengan demikian, epiblas tersebut, melalui proses gastrulasi, adalah sumber dari semua *germ layers*, dan sel-sel di lapisan ini akan mendukung pembentukan semua jaringan dan organ dalam embrio (Sadler, 2004).



Gambar 2.1 Invaginasi Sel Epiblas (Sadler, 2004)

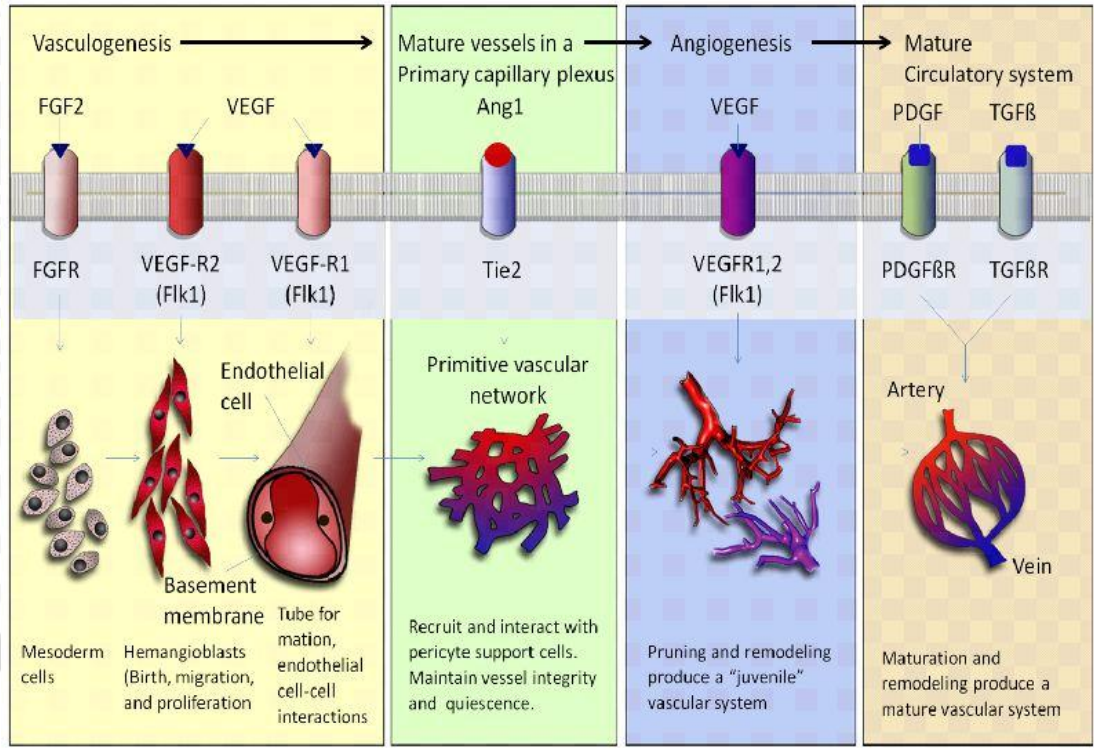
2.2 Vaskulogenesis dan Angiogenesis pada Embrio

Pembuluh darah terbentuk dalam dua cara. Pertama, vaskulogenesis, yaitu proses dimana pembuluh darah terbentuk *de novo* (Goldie, 2008). Vaskulogenesis memulai pembentukan jantung dan pleksus pembuluh darah pertama yang primitif di dalam embrio dan dalam membran sekitarnya, seperti sirkulasi *yolk sac* (Patan, 2004). Proses ini pertama terjadi di *yolk sac* embrio, dan kemudian selama perkembangan dalam embrio (Goldie, 2008). Kedua yaitu angiogenesis, di mana pembuluh baru tumbuh dari pembuluh yang sudah ada. Angiogenesis bertanggung jawab atas renovasi dan perluasan jaringan pembuluh darah. Sementara vaskulogenesis mengacu pada diferensiasi *in situ* dan pertumbuhan pembuluh darah dari mesodermal yaitu hemangioblas, angiogenesis terdiri dari dua mekanisme yang berbeda: *sprouting* endotel dan pertumbuhan mikrovaskuler intususeptif (IMG).

Proses *sprouting* didasarkan pada migrasi sel endotel, proliferasi dan pembentukan tabung (Patan, 2004).

Pulau-pulau darah pertama muncul dalam mesoderm sekitar dinding *yolk sac* pada 3 minggu perkembangan dan sebentar kemudian di *lateral plate* mesoderm dan daerah lain. Pulau-pulau ini muncul dari sel-sel mesoderm yang diinduksi oleh faktor pertumbuhan fibroblas 2 (FGF - 2) untuk membentuk hemangioblas, prekursor umum untuk pembentukan pembuluh dan sel darah. Hemangioblas di tengah-tengah pulau darah membentuk sel-sel induk hematopoietik, prekursor dari semua sel darah, sedangkan hemangioblas perifer berdiferensiasi menjadi angioblas, prekursor pembuluh darah. Angioblas ini berkembang biak dan akhirnya diinduksi untuk membentuk sel-sel endotel oleh faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF) yang disekresikan oleh sel-sel mesoderm di sekitarnya. Faktor yang sama ini kemudian mengatur perpaduan dari sel-sel endotel menjadi pembuluh darah primitif yang pertama.

Setelah proses vaskulogenesis menetapkan dasar vaskular primer, pembuluh darah tambahan ditambahkan oleh angiogenesis melalui bermunculannya pembuluh darah baru. Proses ini juga dimediasi oleh VEGF, yang merangsang proliferasi sel endotel pada titik-titik di mana pembuluh darah baru yang akan terbentuk. Pemodelan akhir dan stabilisasi dari pembuluh darah diselesaikan oleh *platelet-derived growth factor* (PDGF) dan *transforming growth factor* (TGF -) sampai pola dewasa terbentuk (Sadler, 2004).



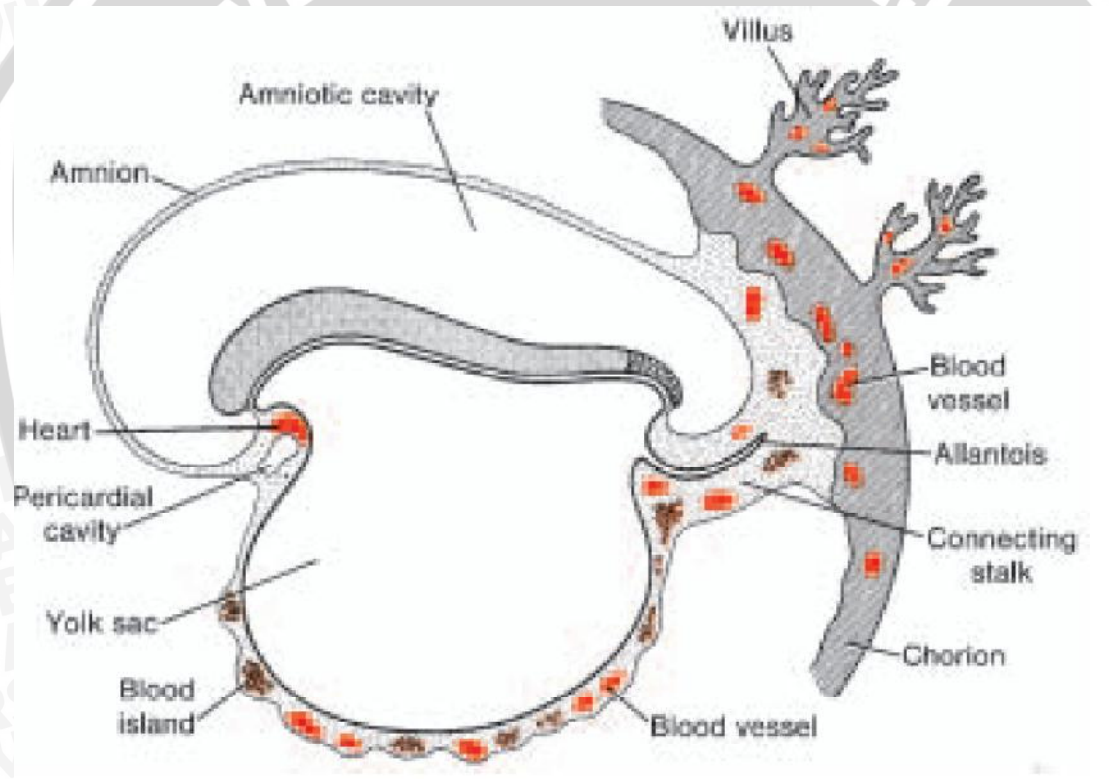
Gambar 2.2 Vaskulogenesis dan Angiogenesis (Li, 2013)

2.2.1 Vaskulogenesis Ekstraembrionik

Mesoderm embrio, *yolk sac* ekstra-embrio, allantois dan plasenta telah diidentifikasi sebagai sumber endotel vaskuler, sel-sel progenitor hematopoietik dan situs vaskulogenesis (Caprioli et al., 2001). Vaskulogenesis lebih jauh lagi dibagi berdasarkan apakah itu terjadi di dalam kompartemen ekstraembrionik atau intraembrionik. Bukti yang tersedia menunjukkan bahwa 2 gelombang vaskulogenesis ini memiliki waktu dan tempat yang berbeda, dan studi molekuler menunjukkan bahwa sebagian vaskulogenesis ekstra dan intraembrionik memiliki perbedaan di tingkat mekanik.

Vaskulogenesis ekstraembrionik mendahului perkembangan vaskuler intraembrionik, dan pada mamalia pertama terlihat seperti *blood islands* berkumpul dalam lapisan mesoderm dari *yolk sac*. *Blood island* adalah fokus dari hemangioblas yang berdiferensiasi *in situ*, membentuk massa dalam longgar dari prekursor

hematopoietik embrio dan lapisan luminal luar angioblas. *Blood islands* akhirnya menyatu menjadi sebuah jaringan pembuluh darah fungsional yang merupakan sirkulasi vitelline, yang disesuaikan untuk mentransfer nutrisi dari *yolk sac* ke embrio. Bukti terbaru menunjukkan bahwa pembuluh darah ekstraembrionik juga mungkin timbul secara independen dari *blood islands* melalui diferensiasi langsung angioblas dari mesoderm. Pembuluh darah yang timbul melalui vaskulogenesis *yolk sac* berhubungan dengan sirkulasi janin melalui vena vitelline, tetapi tidak memberikan kontribusi terhadap pembuluh darah intraembrionik (Ferguson, 2005).



Gambar 2.3 Pembentukan Pembuluh Darah Ekstraembrionik (Sadler, 2004)

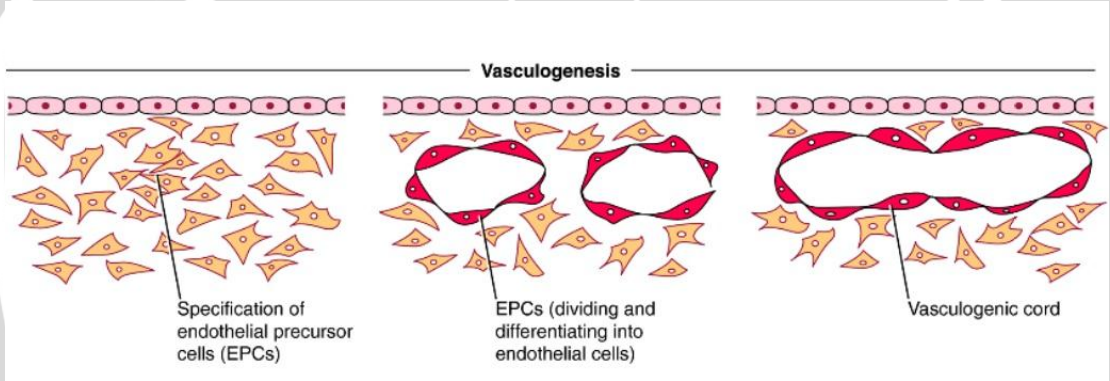
2.2.2 Vaskulogenesis Intraembrionik

Pada hari ke-18, pembuluh darah mulai berkembang di mesoderm splanknikus intraembrionik. Tidak seperti pembentukan pembuluh darah dalam mesoderm ekstraembrionik, pembentukan pembuluh darah intraembrionik

mesoderm splanknik tidak disertai dengan hematopoiesis. Zat yang dikeluarkan oleh endoderm menyebabkan beberapa sel mesoderm splanknikus berdiferensiasi menjadi EPC (atau angioblas), yang berkembang menjadi sel-sel endotel dan bergabung untuk membentuk struktur vesikuler kecil. Struktur vesikuler, pada gilirannya, menyatu menjadi tabung panjang atau pembuluh. Pembuluh ini berkembang di seluruh mesoderm intraembrionik dan menyatu untuk membentuk jaringan luas pembuluh yang menetapkan pengaturan awal dari sistem sirkulasi embrio. Jaringan ini tumbuh dan menyebar ke seluruh embrio dengan 4 proses utama: (1) melanjutkan pembentukan, migrasi, dan penyatuan angioblas, (2) angiogenesis, (3) intususepsi vaskuler (*nonsprouting* angiogenesis), di mana pembuluh darah yang ada dibagi untuk menghasilkan pembuluh tambahan, dan (4) penambahan angioblas baru ke dinding pembuluh yang sudah ada (Schoenwolf, 2009).

Endokardium dan pembuluh darah besar adalah struktur endotel intraembrionik pertama yang terbentuk selama perkembangan. Endokardium berasal dari kumpulan angioblas yang bermigrasi, yang berasal dari mesoderm presomit kranial yang masuk ke area perikardial untuk membentuk pleksus vaskuler yang berdekatan dengan miokardium yang sedang berkembang. Pleksus ini mengalami pemodelan ulang untuk membentuk tabung endokardium, yang merupakan struktur vaskuler pertama yang dibentuk di embrio. Simultan dengan perkembangan jantung, vaskulogenesis dimulai dalam primordia aorta, kumpulan mesoderm yang berada di sisi lateral garis tengah, untuk membentuk aorta dorsal dan vena kardinal. Selama perkembangan ini, angioblas yang berdiferensiasi membentuk jaringan vaskuler primer, yang kemudian dimodel ulang secara dua arah untuk menghasilkan aorta bilateral pada embrio.

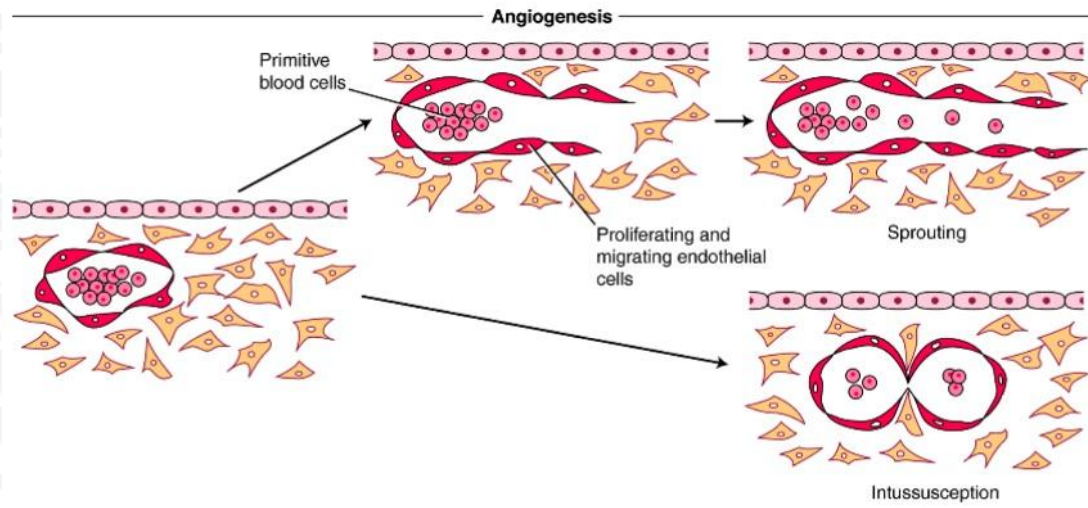
Sementara jantung membesar, difusi pasif nutrisi dan limbah menjadi terbatas, sehingga pembuluh darah koroner pun dibentuk untuk memasok jaringan jantung yang aktif secara metabolik. Sel prekursor vaskuler (termasuk endotel dan sel progenitor otot polos) berada dalam pro-epikardium (PE), yaitu massa sel yang berasal dari mesoderm splanknik, berhubungan dengan septum transversum di bagian inferior jantung. Setelah menyebar ke seluruh jantung, sel-sel ini mengalami transformasi epitel-ke-mesenkim (EMT), dan menempel pada mesoderm yang mendasarinya, di mana mereka kemudian membentuk kapiler, vena, dan arteri dari pembuluh darah koroner (Ferguson, 2005).



Gambar 2.4 Vasculogenesis Intraembrionik (Schoenwolf, 2009)

2.2.3 Angiogenesis

Angiogenesis didefinisikan sebagai pembentukan pembuluh baru dengan bermunculannya sel endotel dari pembuluh yang sudah ada, atau angiogenesis intususeptif (IA), penyisipan transluminal pilar jaringan dalam kapiler yang sudah ada untuk membentuk pembuluh darah baru. Angiogenesis dimulai pada embrio dan memediasi pembentukan mayoritas pembuluh darah pada embrio. Angiogenesis juga bertanggung jawab atas vaskularisasi organ yang berasal dari ektoderm-mesoderm, termasuk otak dan ginjal (Patel-Hett, 2011).



Gambar 2.5 Angiogenesis (Schoenwolf, 2009)

2.3 Tahap Perkembangan Embrio Ayam

Tabel 2.1 Data Perbandingan Umur Embrio (Spesies/Hari) (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			

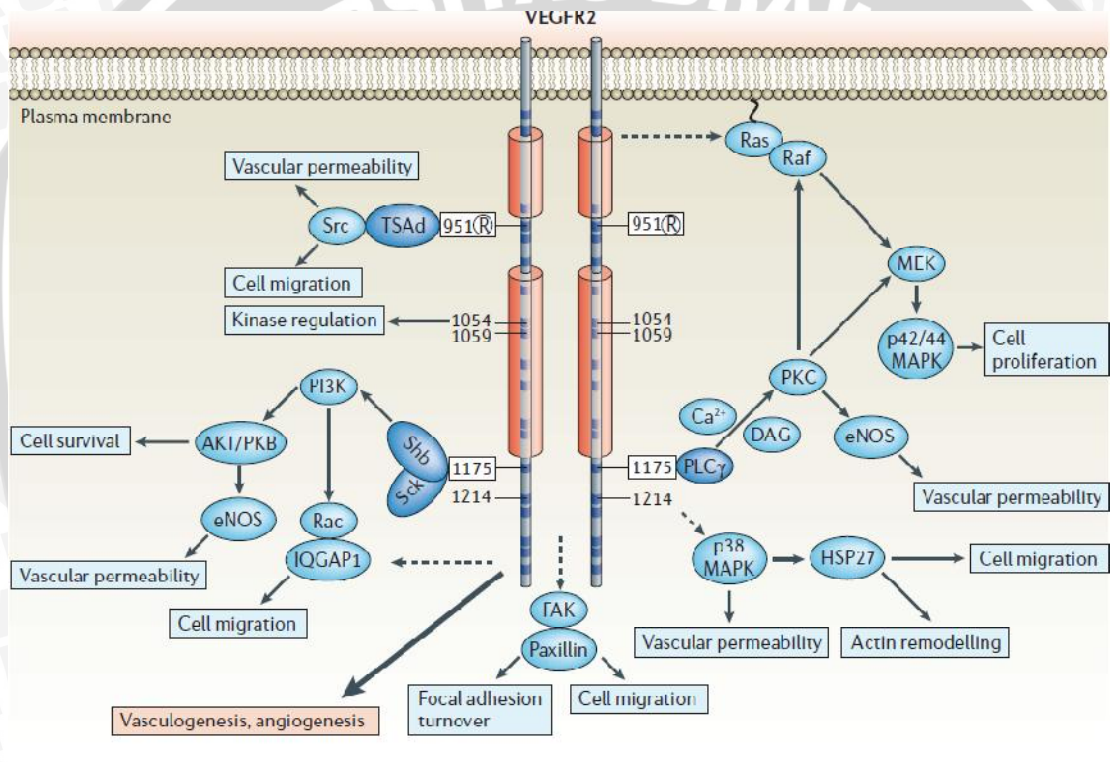
2.4 VEGF dan Reseptornya

VEGF berasal dari keluarga VEGF, yang saat ini terdiri dari enam anggota: VEGF-A (atau VEGF), PlGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, dan virus orf VEGF (VEGF-E). Hilangnya satu alel saja dari VEGF dapat mematikan embrio, menyiratkan bahwa faktor ini memainkan peran yang unik dalam perkembangan sistem vaskuler. VEGF diekspresikan pada jaringan yang berbeda, termasuk otak, ginjal, hati, limpa, dan oleh banyak jenis sel. *In vitro*, VEGF merangsang degradasi ECM, proliferasi, migrasi, dan pembentukan tabung sel endotel dan menginduksi dalam sel-sel ini, ekspresi UPA, PAI-1, uPAR, dan MMP-1. *In vivo*, VEGF dapat mengatur permeabilitas pembuluh darah, yang penting untuk inisiasi angiogenesis (Liekens, 2001).

Awalnya, tempat pengikatan VEGF diidentifikasi pada permukaan sel dari sel-sel endotel vaskular *in vitro* dan *in vivo*. Selanjutnya, menjadi jelas bahwa reseptor untuk VEGF juga terdapat pada sel-sel sumsum tulang yang diturunkan. VEGF mengikat dua reseptor tirosin kinase terkait (RTK), VEGFR-1 dan VEGFR-2. VEGFR-3 adalah anggota dari keluarga RTKs yang sama, tetapi bukanlah reseptor untuk VEGF (Ferrara *et al*, 2003). VEGFR-1 dan VEGFR-2 adalah reseptor tirosin kinase yang terkait erat dan keduanya memiliki ligan umum dan spesifik. VEGFR-1 adalah RTK yang kekurangan kinase, sedangkan VEGFR-2 adalah kinase yang sangat aktif.

Pengikatan VEGF ke VEGFR-1 memiliki mekanisme molekuler yang belum jelas. Hal ini sebagian dikarenakan ketidakmampuan reseptor untuk merespon VEGF-A dengan peningkatan aktivitas kinase (Gille *et al*, 2000). Sedangkan pengikatan VEGF ke VEGFR-2 menghasilkan autofosforilasi dari residu tirosin berikut: Tyr951 dan Tyr996, yang terdapat dalam domain *kinase-insert*, Tyr1054 dan

Tyr1059, yang terdapat dalam domain kinase, dan Tyr1175 dan Tyr1214 di ekor C-terminal (Hoeben *et al*, 2004). VEGFR-1 maupun VEGFR-2, keduanya diperlukan untuk perkembangan normal dan angiogenesis (Rahimi, 2006). VEGFR-1 diperlukan untuk perekrutan prekursor haematopoietik dan migrasi monosit serta makrofag, sedangkan VEGFR-2 dan VEGFR-3 sangat penting untuk fungsi endotel pembuluh darah dan sel-sel *lymphendothelial* (Olsson *et al*, 2006).



Gambar 2.6 Situs Fosforilasi Reseptor VEGF 2 (Olsson, 2006)

2.5 Regulasi Positif dan Negatif

Stimulator angiogenesis terdiri dari faktor pertumbuhan seperti faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF), faktor pertumbuhan fibroblast (FGF), *platelet-derived growth factor*, dan kondisi hipoksia yang mengaktifkan *hypoxia-inducible factor-1*, yang dapat mengatur meningkatnya protein angiogenik, juga

onkogen angiogenik, seperti Ras, dan penekan tumor, seperti p53. Inhibitor endogen angiogenesis meliputi berbagai peptida anti-angiogenik, metabolit hormon, dan modulator apoptosis. Beberapa protein endogen yang tampaknya sangat penting dalam menghambat angiogenesis adalah angiostatin, endostatin, dan trombospondin (Nyberg, 2005).

Pengaturan mekanisme molekular yang berbeda pada vaskulogenesis dan angiogenesis, dibahas sehubungan dengan regulator positif yang paling penting, yaitu VEGF dan reseptornya Flk-1 dan Flt-1, Angiopoietin / sistem Tie dan sistem ephrin-B/EpH-B (Patan, 2004). Vaskulogenesis dimulai ketika VEGF berikatan dengan yang pertama dari dua reseptor yang dimilikinya, yaitu protein VEGFR-2 (Flk1). Sinyal ini menyebabkan diferensiasi sel-sel mesoderm menjadi sel endotel, termasuk multiplikasi sel endotel. Ketika gen Flk1 disingkirkan, embrio tikus mati pada hari ke-8, dan embrio tersebut tidak memiliki sel-sel endotel. Pembentukan tabung kapiler terjadi ketika VEGF berikatan dengan reseptor kedua, VEGFR-1 (Flt1). Dengan tidak adanya sinyal ini, pembuluh darah gagal terbentuk dari sel-sel endotel, dan embrio tikus mati pada hari ke-8.

Langkah berikutnya melibatkan interaksi dari endotel pembuluh darah dengan sel mesodermal pendukung. Faktor Angiopoietin-1 berikatan dengan reseptor tirosin kinase Tie2 dan memungkinkan pembuluh darah untuk merekrut sel peri-endotel yang akan mengelilinginya. Sel-sel ini menjadi perisit dan jaringan otot polos pembuluh darah, dan memiliki peran penting dalam menjaga stabilitas pembuluh darah. Ketika gen Tie2 dihilangkan, pembuluh darah ini mudah terganggu, dan embrio tikus mati sekitar hari ke 9 dan 10.

Jika angiogenesis terjadi, terdapat dua sinyal yang tampaknya diperlukan. Kombinasi Angiopoietin-2 dan VEGF menyebabkan melonggarnya sel pendukung

dan mempengaruhi kemampuan multiplikasi dari sel-sel endotel yang baru terekspos. Angiopoietin-2 bekerja dengan menghalangi sinyal Tie2. Jika kemudian Angiopoietin-2 ditambah dengan sinyal dari VEGF, angiogenesis pun terjadi. Jika Angiopoietin-2 menghambat kinase Tie2 tanpa ada sinyal VEGF, endotel pembuluh darah akan terpisah dengan sel-sel periendothelial, dan sel-sel endotel akan kehilangan kontak satu dengan yang lain (Gilbert, 2010).

2.6 Quercetin

Quercetin adalah antioksidan flavonoid yang ditemukan dalam buah-buahan dan sayuran berpigmen. Menurut sentra medik *University of Maryland* dan "*Psychology Today*," buah jeruk, apel, peterseli, anggur merah dan teh, semuanya mengandung quercetin. Buah-buahan berpigmen gelap seperti beri dan zaitun juga mengandung quercetin. Apel adalah sumber yang signifikan dari quercetin. *US Department of Agriculture* menemukan bahwa apel utuh dan segar menyediakan sekitar 4,4 miligram quercetin untuk setiap 100 gram apel. Untuk apel berukuran sedang biasanya sekitar 150 gram, tiap apel dapat berisi sampai sekitar 10 miligram quercetin. Untuk mengoptimalkan konten quercetin, penting juga untuk memakan kulit-kaya pigmen milik apel. Apel tanpa kulit mengandung kurang dari setengah jumlah quercetin pada apel dengan kulit. Jus apel biasanya mengandung kurang dari sepersepuluh jumlah quercetin di seluruh apel (Stone, 2011).

2.7 Farmakokinetik dan Farmakodinamik Quercetin

Salah satu karakteristik dari bioavailabilitas quercetin adalah bahwa eliminasi metabolit quercetin cukup lambat, dengan paruh waktu yang dilaporkan berkisar 11-28 jam. Hal ini dapat mendukung akumulasi dalam plasma dengan asupan berulang (Manach *et al*, 2005). Flavonoid quercetin adalah chelator besi yang kuat, yang mampu mengoksidasi besi heme dalam hemoglobin dari Fe (2 +) menjadi Fe (3 +).

Selain itu, quercetin melintasi plasenta dan terakumulasi pada janin. Selama perkembangan janin, paparan quercetin tidak berpengaruh pada turunan erythroid dan globin. Namun, tikus dewasa yang terpapar quercetin memiliki peningkatan cadangan besi yang signifikan dalam hati, dengan regulasi kenaikan besi terkait ekspresi sitokin (hepcidin, IL-1, IL-6 dan IL-10) (Vanhees *et al*, 2011). Quercetin juga memiliki sifat antihistamin dan anti-inflamasi. Quercetin dikenal dapat menstabilkan sel-sel yang melepaskan histamin dalam tubuh. Selain itu, telah ditunjukkan dalam percobaan di laboratorium mengenai quercetin yang memiliki efek perlindungan terhadap penyakit jantung dan kanker (Landsman, 2011).

2.8 Peran Quercetin dalam Menghambat Angiogenesis

Terdapat beberapa efek anti kanker quercetin yang telah diteliti, termasuk: *assay* pada cincin aorta tikus menunjukkan bahwa quercetin pada konsentrasi non-toksik secara signifikan menghambat *microvessel sprouting* dan menunjukkan penghambatan yang signifikan dalam proliferasi, migrasi, invasi dan pembentukan tabung sel-sel endotel, yang merupakan peristiwa penting dalam proses angiogenesis. Analisis *Western blot* juga menunjukkan bahwa quercetin menekan fosforilasi yang diinduksi VEGF pada reseptor VEGF 2 dan protein kinase AKT, mTOR, dan protein ribosom S6 kinase di HUVECs (Pratheeshkumar *et al*, 2012). Penelitian lain menunjukkan, quercetin terletak di peringkat ke-5 dari flavonoid yang berpotensi menghambat sekresi protein VEGF. Quercetin juga menunjukkan penghambatan yang kuat untuk proliferasi sel dan ekspresi VEGF pada sel kanker ovarium manusia. VEGF mRNA di sel Ovar-3 mengalami penurunan setelah paparan quercetin dengan konsentrasi 20 μ M. Tingkat protein VEGF secara signifikan menunjukkan penurunan oleh paparan 7 bahan kimia: apigenin, taxifolin, luteolin, quercetin, cisplatin, genistein, dan kaempferol ($p < 0,05$) (Luo, 2008).

Quercetin dapat mengurangi kejadian karsinoma mammae yang diinduksi oleh 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) dan pertumbuhan tumor pada hewan coba tikus, hal ini terjadi melalui dua mekanisme. Pertama, yaitu penghambatan sintesis protein H-ras yang menyebabkan penghambatan proliferasi sel dan angiogenesis tumor. Kedua, penghambatan ekspresi faktor pertumbuhan yang terkait angiogenesis seperti VEGF dan bFGF, sehingga angiogenesis dalam karsinoma mammae dapat ditekan (Kong *et al*, 2005). Uji CAM mengungkapkan bahwa pemberian quercetin memberikan efek antiangiogenik *in vivo*. Setelah paparan quercetin, terjadilah penurunan ekspresi dan aktivitas matriks metaloproteinase-2, yang terlibat dalam proses angiogenik berupa migrasi, invasi, dan pembentukan tabung, yang diamati dengan *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR) dan gelatin *zymography* (Tan *et al*, 2003).

Quercetin (20 mg / kg / d) secara signifikan mengurangi volume dan berat tumor padat di prostat tikus model *xenograft*, menunjukkan bahwa quercetin menghambat tumorigenesis dengan menargetkan angiogenesis (Pratheeshkumar *et al*, 2012). Pada uji CAM, terdapat skrining berbagai konsentrasi quercetin bersama dengan obat anti-angiogenik asam retinoat (RA) sebagai kontrol positif. Setelah pemberian obat, penurunan pembentukan pembuluh darah baru diamati. Konsentrasi quercetin yang digunakan berturut-turut 2.5, 5, 7.5, dan 10 g. Di antara semua konsentrasi yang digunakan dalam uji ini, 10 g menunjukkan penghambatan angiogenesis terbaik dibandingkan dengan kontrol positif (Anand *et al*, 2011). Quercetin dapat menghambat proliferasi sel endotel menurut dosis tertentu. Telah dilakukan penelitian untuk menilai efek quercetin pada angiogenesis koroid dan retina secara *in vitro* menggunakan rhesus *choroids-retina endothelial cell line*.

Ditunjukkan penghambatan 10,1%, 42,6% dan 65,2% dengan pemberian 10, 50 dan 100 M quercetin (Chen *et al*, 2008).

Di antara berbagai sistem hewan model yang dirancang untuk mempelajari mekanisme yang mendasari angiogenesis, model embrio ayam adalah alat yang berguna dalam menganalisis potensi angiogenik (Deryugina, 2008)

