

## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Pengaruh Pemberian Quercetin terhadap *Survival Rate*

Uji Fisher terhadap hasil *survival rate* menghasilkan hasil yang signifikan ( $p = 0.001$ ). Hasil ini menunjukkan bahwa ada hubungan antara dosis dengan *survival rate*. Tabel 5.1 menunjukkan, pada kelompok kontrol didapatkan embrio yang hanya berkembang sampai *blood island* sejumlah 4 ekor (28.57%), sedangkan yang memiliki kapiler sempurna hingga jantung sejumlah 10 ekor (71.43%). Pada kelompok B didapatkan 2 sampel yang mati (15.38%). Didapatkan 9 sampel dengan *blood island* (69.23%) dan 2 sampel hidup (15.38%). Pada kelompok C didapatkan 3 sampel embrio mati (25%). Didapatkan 8 sampel mencapai perkembangan *blood island* (66.67%) dan tidak ada satupun sampel yang berhasil mencapai sirkulasi kapiler (0%). Pada kelompok D didapatkan tidak ada sampel yang mati, dan 8 sampel *blood island* (66.67%) disertai 4 sampel yang hidup (33.33%).

Embrio dianggap hidup jika pada saat telur dibuka, ada sirkulasi kapiler dan atau jantung pada blastodisk. Jika tidak ada sirkulasi kapiler dan atau jantung berarti embrio gagal tumbuh atau mati. Hal ini disebabkan karena jika tidak ada struktur vaskular yang baik untuk sumber nutrisi dan pembuangan bahan sisa maka sulit bagi embrio untuk bertahan hidup. Jika ada *blood island* maka dimasukkan sebagai kriteria *blood island*. *Survival* embrio dapat bergantung pada 2 faktor, internal dan eksternal. Faktor internal disebabkan oleh kondisi embrio pada awal-awal kehidupan yang rentan terhadap pengaruh dari luar (Rahayu, 2011). Faktor eksternal dalam penelitian ini disebabkan oleh pemberian quercetin yang mempengaruhi vaskulo-angiogenesis pada embrio.

l didapatkan embrio yang hanya berkembang sampai

*blood island* sejumlah 4 ekor (28.57%), sedangkan yang memiliki kapiler sempurna hingga jantung sejumlah 10 ekor (71.43%). Hal ini dapat dikarenakan pengaruh faktor internal masing-masing telur sehingga perkembangan embrio dapat berbeda. Tidak ada kematian embrio pada perlakuan kontrol. Pada hasil tersebut didapatkan pada kelompok A / kontrol sebanyak 71,43% embrio menunjukkan tanda kehidupan dalam batas yang normal.

Pada kelompok B didapatkan 2 sampel yang mati (15.38%), yang kemungkinan besar disebabkan karena quercetin menyebabkan penghambatan yang signifikan dalam proliferasi, migrasi, invasi dan pembentukan lumen pembuluh darah (Landsman, 2011) sehingga tidak terjadi vaskulogenesis ataupun angiogenesis dan mengakibatkan embrio tidak berhasil bertumbuh dan mati. Didapatkan 9 sampel dengan *blood island* (69.23%) dan 2 sampel hidup (15.38%). Walaupun terjadi penghambatan vaskulo-angiogenesis, sebagian masih dapat berkembang menjadi sirkulasi kapiler. Dapat terlihat perbedaan dengan kelompok kontrol, dimana terjadi penghambatan oleh quercetin terhadap sirkulasi *yolk sac* dan akhirnya pada *survival rate*.

Pada kelompok C didapatkan 3 sampel embrio mati (25%). Hasil ini sejalan dengan dosis quercetin yang bertambah. Adanya pengaruh dari quercetin, yang memiliki efek penghambatan yang kuat terhadap pembentukan lumen pembuluh darah dan proliferasi sel endotel menyebabkan hambatan vaskulo-angiogenesis dan akhirnya dapat berujung ke kematian embrio (Ahn, 2009). Didapatkan 8 sampel mencapai perkembangan *blood island* (66.67%) dan tidak ada satupun sampel yang berhasil mencapai sirkulasi kapiler (0%). Terlihat hasil yang *dose-dependent* dengan

quercetin. Hasil ini membuktikan bahwa kenaikan dosis

quercetin menyebabkan penurunan *survival rate* yang cukup signifikan.

Hasil kelompok D menunjukkan tidak ada sampel yang mati, dan 8 sampel *blood island* (66.67%) disertai 4 sampel yang hidup (33.33%). Hal ini dikarenakan kemungkinan pada kelompok D terjadi fenomena *all-or-none* dimana jika terdapat paparan teratogen pada embrio sebelum organogenesis, dapat menghasilkan antara 2 hasil yaitu tidak ada efek pada embrio, atau kematian embrio (Adam, 2012). Mengenai mekanisme tepatnya terjadi *all-or-none* hingga saat ini belum ada teori yang pasti, tetapi salah satu teori yang mungkin terjadi adalah dikarenakan kejenuhan reseptor VEGF-2 (Tan, 2013). Hal ini dimungkinkan karena quercetin mengikat dan memenuhi reseptor VEGF-2 sehingga reseptor-reseptor yang ada mengalami kejenuhan. Jenuhnya reseptor VEGF-2 ini akhirnya membuat pemberian quercetin lebih lanjut tidak memberikan efek anti angiogenesis seperti yang sebelumnya.

Salah satu model fenomena *all-or-none* adalah serat otot. Begitu timbul suatu potensial aksi pada titik manapun dalam membran serat otot normal, proses depolarisasi akan berlangsung sepanjang membran jika kondisinya memungkinkan, atau tidak sama sekali jika keadaan tidak memungkinkan. Keadaan ini disebut prinsip *all-or-none* (Guyton, 1997). Fenomena yang terjadi pada serat otot ini sayangnya tidak sama dengan yang terjadi pada embrio, dimana pada embrio didapatkan terjadi seluruh sampel mati atau hidup seluruhnya.

Pada penelitian ini terlihat bahwa pada kelompok D menghasilkan efek *all-or-none* berupa seluruh sampelnya berhasil hidup. Akan tetapi walaupun berhasil hidup, perkembangan sirkulasi yang dicapai tidak sebaik yang dicapai kelompok kontrol. Dari kelompok D sebanyak 66.67% hanya mencapai *blood island* sedangkan

nyak 33.33%. Dapat dibandingkan dengan kontrol

dimana yang mencapai *blood island* sebanyak 28.57% sedangkan yang mencapai sirkulasi kapiler sebanyak 71.43%. Hal ini menunjukkan bahwa walaupun terjadi fenomena *all-or-none* dimana seluruh sampel berhasil hidup, tetap saja paparan teratogen, dalam penelitian ini berupa pemberian quercetin, dapat menghasilkan malformasi pada embrio.

Kematian yang terjadi pada kelompok perlakuan dapat juga disebabkan oleh induksi apoptosis oleh quercetin (Lin, 2012). Kematian sel pada embrio preimplantasi terjadi dengan apoptosis yang berfungsi untuk menghilangkan sel-sel yang tidak diinginkan selama transisi perkembangan penting yang terjadi selama periode ini. Embrio preimplantasi mengekspresikan gen yang terlibat dalam regulasi dan pelaksanaan apoptosis. Sel-sel pada embrio dapat mengalami apoptosis walaupun tidak ada faktor eksogen. Pengaturan apoptosis pada embrio preimplantasi sangat penting bagi kelangsungan hidup embrio dan perkembangan selanjutnya (Brison, 2000). Apabila apoptosis pada embrio diinduksi oleh pemberian quercetin, maka hal ini akan mempengaruhi *survival rate* embrio. Embrio dapat mengalami kematian ataupun hidup tetapi dengan defek dikarenakan sel-selnya mengalami apoptosis.

Gambar 5.2 mengenai grafik *survival rate* embrio ayam menunjukkan terjadinya penurunan yang *dose-dependent* dari kelompok A ke kelompok C. Barulah pada kelompok D terjadi kenaikan *survival rate*. Hasil ini menunjukkan pengaruh quercetin pada VEGFR-2 menyebabkan penghambatan terbesar pada kelompok C. Pada kelompok D terjadilah fenomena *all-or-none* yang mekanismenya masih belum jelas.

am lebih lanjut dibandingkan dengan persentase area

VEGFR-2. Hasil kelompok B menunjukkan penurunan dari kelompok A baik untuk *survival rate* maupun persentase area. Penurunan yang *dose-dependent* terlihat dalam hasil dari kelompok C pada kedua parameter. Hasil kelompok D menunjukkan kenaikan baik *survival rate* maupun persentase area. Teori yang mungkin terjadi ialah *all-or-none* pada kelompok D.

## 6.2 Pengaruh Pemberian Quercetin terhadap Jumlah Somit Embrio Ayam

### umur 48 Jam

Tabel 5.2 dan Gambar 5.4 menunjukkan perbandingan mean jumlah somit antara kelompok A, B, C dan D. Pada kelompok A (kontrol) didapatkan rata-rata jumlah somit 15. Pada kelompok B didapatkan rata-rata 12.71 somit. Pada kelompok C didapatkan somit menurun sesuai penambahan dosis, rata-rata 11.71 somit. Pada kelompok D didapatkan rata-rata jumlah somit 12.14.

Somit adalah blok-blok mesoderm yang terletak di kedua sisi tabung saraf (*neural tube*) pada embrio vertebrata yang sedang berkembang. Somit adalah populasi sel prekursor yang membentuk struktur penting terkait dengan rancangan tubuh vertebrata dan akhirnya akan berdiferensiasi menjadi dermis, otot rangka, tulang rawan, tendon, dan tulang belakang (DeRuiter, 2010). Pola somit disesuaikan dengan wadah somit masing-masing, yaitu dermomiotor, miotor, dan sklerotor, tergantung pada sinyal molekuler dari struktur sekitarnya, termasuk ektoderm permukaan, tabung saraf, notokord, dan plat lateral mesoderm (Krück, 2013). Dermomiotor akan membentuk lapisan kulit yang menutupi otot skeletal pada tubuh dan ekstremitas. Sedangkan sklerotor akan membantu pembentukan kartilago dan tulang rusuk serta tulang belakang. Somit pada vertebrata seperti burung dan

tubuh dan ekstremitas pada organisme tersebut

(Buckingham, 2003).

Pembentukan somit dapat dibagi menjadi tiga fase utama. Pertama, fase pertumbuhan di mana sel-sel mesoderm paraksial baru diproduksi oleh zona pertumbuhan dan menjadi dua batang jaringan mesenkimal, membentuk mesoderm presomit (PSM). Kedua, fase pembentukan pola terjadi di PSM, di mana informasi segmental yang ada pada PSM digunakan untuk membentuk rancangan pola segmental di PSM rostral. Ketiga, identitas somit rostro-kaudal (RC) dibentuk, dan segera diikuti dengan pembentukan batas somit (Pourquié, 2004).

Pada embrio ayam, sebuah somit baru terbentuk setiap 90 menit, dan somit muncul tepat pada saat yang sama pada kedua sisi embrio. Setelah somit terbentuk, berbagai bagian di dalamnya akan ditentukan untuk membentuk jenis sel tertentu saja dan akhirnya akan menyusun tubuh organisme (DeRuiter, 2010).

Hasil dari kelompok A (kontrol) menunjukkan rata-rata jumlah somit 15. Batas normal somit pada embrio ayam umur 48 jam adalah 16-18 somit (Hamburger and Hamilton, 1951). Adanya jumlah somit yang tidak normal pada kelompok kontrol kemungkinan disebabkan karena faktor internal dari telur. Embrio preimplantasi manusia menunjukkan kecenderungan tinggi terjadinya apoptosis sel dan terhentinya perkembangan selama minggu pertama *in vitro*. Hubungan antara keduanya tidak jelas dan sulit untuk dibuktikan dengan pendekatan eksperimental konvensional, sebagian karena jumlah embrio yang terbatas (Hardy, 2001). Embrio ayam hingga usia 48 jam, serupa dengan embrio masa preimplantasi pada mamalia (tikus dan manusia) (Rahayu, 2011). Oleh karena itu pada embrio ayam juga dapat terjadi kecenderungan yang tinggi untuk mengalami apoptosis sel dan terhentinya

kin mendasari perkembangan somit yang tidak normal

walaupun tidak ada faktor eksternal.

Pada kelompok B didapatkan rata-rata 12.71 somit. Pada kelompok B dapat dilihat pengaruh pemberian quercetin, terjadi penurunan jumlah somit normal. Pada kelompok C didapatkan somit menurun sesuai penambahan dosis, rata-rata 11.71 somit. Penghambatan pembentukan somit seperti yang terlihat pada hasil di atas, selain karena hambatan pada reseptor VEGF 2 yang secara tidak langsung dapat menghambat perkembangan somit embrio, dapat juga terjadi karena proses berikut. Proses kontraktile yang *calcium-dependent* dalam pembentukan somit dari plat mesoderm segmental diselidiki menggunakan agonis  $Ca^{2+}$  serta antagonis  $Ca^{2+}$  dan kalmodulin. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa somitogenesis merupakan proses yang bergantung pada  $Ca^{2+}$  (Chernoff, 1982). Quercetin sendiri dapat menghambat peningkatan kalsium intraseluler (Weng, 2012). Pemberian quercetin dapat menghambat VEGFR-2 dan juga dapat menghambat peningkatan kalsium intrasel embrio. Kedua hal ini dapat memiliki pengaruh pada pembentukan somit. Hasil pada kelompok B dan C menunjukkan bahwa pemberian quercetin dapat menyebabkan hambatan pada perkembangan somit dan membuktikan pemberian quercetin dapat menurunkan jumlah somit (dalam penelitian ini, diharapkan dapat mewakili morfologi).

Pada kelompok D didapatkan rata-rata jumlah somit 12.14. Hasil dari kelompok D ini menunjukkan adanya kenaikan jumlah somit jika dibandingkan dengan kelompok C. Walaupun terdapat peningkatan jumlah dibandingkan kelompok C, tetapi jumlah somit ini masih kurang dari normal. Didapatkan pula malformasi dan terhentinya perkembangan yang terjadi pada sampel embrio. Hasil ini bertentangan dengan fenomena *all-or-none* yang mengatakan bahwa ekspos

anogenesis akan menyebabkan malformasi yang letal atau menyebabkan kematian (Brent, 2006). Pada kelompok D ini terjadi penghambatan dan malformasi pada sampel yang mendapatkan paparan sebelum organogenesis.

Jika hasil rata-rata jumlah somit dibandingkan dengan *survival rate* maka akan didapatkan hasil yang berhubungan. Pada kelompok B didapatkan terjadi penurunan baik *survival rate* dan juga jumlah somit jika dibandingkan dengan kontrol. Pada kelompok C didapatkan sama-sama terjadi penurunan *survival rate* dan juga jumlah somit jika dibandingkan dengan kontrol dan kelompok B. Penurunan yang terjadi sesuai dengan kenaikan dosis quercetin. Dan pada kelompok D juga didapatkan terjadi kenaikan baik *survival rate* maupun jumlah somit jika dibandingkan dengan kelompok C. Hasil ini mendukung teori fenomena *all-or-none* dimana pada kelompok ini didapatkan tidak ada sampel yang mati walaupun terjadi malformasi dan gangguan pertumbuhan pada embrio.

Pada uji *Kruskal-Wallis*, didapatkan hasil tidak signifikan ( $p = 0.054$ ). Penghitungan data dilakukan lebih lanjut dengan *Cohen's d-type effect size*. *Effect size* adalah besarnya perbedaan antar kelompok. *Absolute effect size* adalah perbedaan antara rata-rata hasil dalam dua kelompok intervensi yang berbeda. Penghitungan *effect size* dilakukan untuk memperlihatkan sebesar apa ukuran suatu efek. Suatu  $p$  yang signifikan terkadang didapat hanya karena jumlah sampel yang besar. Pada jumlah sampel yang kecil seperti pada penelitian ini, dapat digunakan *effect size* untuk menentukan signifikansi statistik. Apabila nilai  $p$  tidak signifikan, jika didapatkan efek besar ( $d \sim 0.8$ ) maka dapat dikatakan suatu sampel memiliki dampak yang besar terhadap hasil (Sullivan, 2012). Kontrol dibanding kelompok B menunjukkan  $d = 1,060$ , kontrol dengan kelompok C  $d = 1,523$ , dan kontrol dengan

a hasil menunjukkan  $effect\ size\ d = 0.8$  yang dalam

klasifikasi Cohen termasuk besar. Oleh karena  $p > 0.05$  maka dapat diambil kesimpulan bahwa dengan jumlah sampel yang sedikit, walaupun menurut probabilitas tidak ada perbedaan somit antara kelompok A, B, C, dan D, tetapi pemberian quercetin tetap memiliki dampak yang besar.

### 6.3 Pengaruh Pemberian Quercetin terhadap Vaskulo-angiogenesis Melalui Persentase Area VEGFR-2

Tabel 5.3 dan Gambar 5.6 menunjukkan hasil mean persentase area kelompok A, B, C, dan D. Persentase area VEGFR-2 pada kelompok B berkurang dibandingkan dengan kontrol atau kelompok A. Penurunan ini sesuai penambahan dosis quercetin, kecuali pada kelompok D. Didapatkan pada kelompok kontrol rata-rata persentase area adalah 59,67%. Pada kelompok B didapatkan 38,17%, sedangkan kelompok C 29,03%. Pada kelompok D didapatkan rata-rata persentase area sebesar 33,22%. Hal ini menunjukkan pengaruh pemberian quercetin yang dapat menurunkan persentase area VEGFR-2 pada embrio ayam umur 48 jam. Terjadi penurunan yang cukup drastis jika dibandingkan dengan kontrol yaitu pada kelompok B sebesar 21.5%, kelompok C 30.64%, dan kelompok D 26.45%. Dari kelompok B ke kelompok C terjadi penurunan sebanyak 9.14%. Pada kelompok C ke kelompok D di pihak lain, terjadi kenaikan sebanyak 4.19%. Kenaikan ini, seperti yang sudah dijelaskan di subbab sebelumnya, kemungkinan dikarenakan terjadinya fenomena *all-or-none*.

Pembentukan sistem vaskular adalah salah satu peristiwa paling awal dan paling penting selama organogenesis pada embrio, karena organisme yang sedang berkembang membutuhkan sistem transportasi untuk memasok oksigen dan nutrisi

sa. Dua proses berbeda yang disebut vaskulogenesis dan angiogenesis akan memulai pembentukan kompleks pembuluh darah yang mencakup seluruh tubuh (Heinke, 2012).

Vaskulogenesis ekstraembrionik mendahului perkembangan vaskuler intraembrionik, dan pertama kali terlihat berupa *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 (Ferguson, 2005).

Proses di luar embrio dilanjutkan oleh proses vaskulogenesis di dalam embrio, yaitu dengan pengeluaran zat oleh endoderm yang 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 (Schoenwolf, 2009).

Angiogenesis sendiri 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 (Patel-Hett, 2011). Pada embrio ayam berusia 48 jam, sudah terbentuk pembuluh

pada tahap perkembangan ini sedikit berbentuk  $\text{E}_q$

(Hamburger and Hamilton, 1951).

Selama beberapa tahun terakhir, sejumlah besar jalur sinyal telah terbukti terlibat dalam pengembangan pembuluh darah embrio (vaskulo-angiogenesis). Secara khusus, faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF/VEGF-R) dan angiopoetin / keluarga reseptor Tie, yang hampir semuanya spesifik untuk sel endotel dan penting bagi pembentukan pembuluh darah fungsional, adalah jalur yang paling banyak dipelajari. Jalur sinyal lainnya adalah Delta / Notch, ephrin / reseptor ephrine, faktor pertumbuhan fibroblas (FGF), faktor pertumbuhan *platelet-derived* (PDGF / PDGF-R) dan keluarga TGF $\beta$  (*transforming growth factor beta*) (Heinke, 2012). 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 of VEGF (VEGF-E) (Liekens, 2001)..

Sistem VEGF-A telah terbukti memiliki peran dalam perkembangan pembuluh dan sel darah embrio. VEGF-A memiliki tingkat ekspresi yang lebih tinggi di bagian anterior, sedangkan populasi sel yang mengekspresikan kedua reseptornya, yaitu VEGFR-1 dan VEGFR-2, terutama berada di bagian posterior. VEGFR-1 dan 2 yang diaktifkan oleh VEGF-A berpengaruh pada pengaturan angiogenesis, permeabilitas vaskular, migrasi sel, dan ekspresi gen (Hiratsuka, 2005; Shibuya, 2011).

Penelitian ini berfokus pada reseptor VEGF 2. VEGFR-2 adalah reseptor tirosin kinase yang diekspresikan oleh subset sel mesoderm. VEGFR-2 berperan dalam pengembangan sel endotel dan sel hematopoietik (HCS), terutama berkontribusi pada pembentukan dan regulasi hemangioblas. Studi yang menargetkan gen menunjukkan bahwa VEGFR-2 sangat penting untuk

sel hematopoietik selama embriogenesis (Hirashima, 2003). Oleh karena itu jika terjadi penghambatan pada reseptor VEGFR-2 maka akan terjadi hambatan pembentukan dan regulasi hemangioblas, yang pada akhirnya akan berakibat pada hambatan vaskulo-angiogenesis embrio.

Semua obat yang digunakan, apakah menargetkan VEGF-A atau reseptornya, memiliki efek yang sama. Fenestrasi endotel hilang, pertumbuhan dan permeabilitas pembuluh darah ditekan, dan aliran darah serta patensi pembuluh berkurang banyak (Sitohy, 2012). Obat, yang dalam hal ini berupa zat aktif yang diberikan pada embrio ayam dalam penelitian ini adalah quercetin. Quercetin, sebuah flavonol yang sering dipelajari dan terdapat dalam berbagai makanan. Ia merupakan flavonol yang banyak dikonsumsi dan banyak terdapat dalam makanan manusia. Quercetin melimpah di bawang, apel, teh dan anggur merah. Quercetin juga adalah antioksidan yang paling ampuh dari seluruh kelompok flavonoid dan memiliki berbagai sifat farmakologi bersama dengan aktivitas anti-tumor untuk berbagai sel kanker. Berbagai penelitian telah menyoroti efek quercetin, yaitu menurunkan regulasi protein p53 mutan, VEGF, HIF-1, serta COX-2 (Anand *et al*, 2011).

Quercetin juga menghambat pembentukan tabung di model HUVEC dan menekan proses angiogenik di *chorioallantoic membran assay* (Weng, 2012). Penelitian lain juga melaporkan bahwa quercetin memiliki efek penghambatan kuat pada VEGF sehingga ikut berperan dalam modulasi angiogenesis (Santini *et al*, 2009). Dari penelitian dan pembuatan *pharmacophore* (bagian dari struktur molekul yang bertanggung jawab untuk efek biologi dan farmakologinya), di antara 9 senyawa, 5 flavonol, kaempferol, quercetin, fisetin, morin, dan rhamnetin terbukti

ang baik dengan afinitas pengikatan yang baik pula

(Lee, 2009).

Sejalan pula dengan penelitian pada media HUVECs, quercetin menghambat kelangsungan hidup sel, ekspresi faktor pertumbuhan endotel vaskular reseptor 2 (VEGFR-2) dan pembentukan pembuluh darah dengan cara yang *dose-dependent* (Zhao, 2014). Quercetin juga telah terbukti dapat menghambat angiogenesis pada metode *in vivo* ikan zebra melalui penekanan fosforilasi yang diinduksi VEGF pada VEGFR-2. Lebih lanjut didapatkan bahwa quercetin menghambat angiogenesis melalui penghambatan sinyal yang dimediasi VEGFR-2 dengan melibatkan beberapa kinase seperti FAK, ERK, Akt, mTOR, dan induksi apoptosis (Lin, 2012).

Kelangsungan hidup dan pertumbuhan sel tergantung pada pasokan oksigen dan nutrisi yang cukup dan pembuangan sisa serta bahan toksik (Sagar, 2006). Pasokan oksigen dan nutrisi serta pembuangan sisa didapatkan dari sistem pembuluh darah. Jika pembentukan atau pertumbuhan pembuluh darah dihambat, maka terjadilah hambatan pertumbuhan atau kematian sel dan akhirnya terjadi kematian jaringan lalu organisme.

Akibat terjadi penghambatan oleh quercetin pada reseptor VEGF 2, maka persentase area yang melambangkan ekspresi reseptor tersebut mengalami penurunan yang cukup drastis seperti yang telah ditunjukkan oleh pembahasan di atas. Hasil ini menunjukkan bahwa quercetin memiliki pengaruh yang bermakna sebagai anti vaskulo-angiogenesis, yang bekerja di VEGFR-2.

Hasil antara *survival rate*, jumlah somit, dan persentase area VEGFR-2, semuanya memiliki kesamaan yaitu terjadi penurunan yang pertama pada kelompok B, dan penurunan terbesar pada kelompok C. Hasil kelompok D menunjukkan kenaikan baik *survival rate*, jumlah somit, maupun persentase area VEGFR-2. Hal ini

ena *all-or-none* yang terjadi pada embrio preimplantasi

sebelum organogenesis, walaupun mekanisme pasti terjadinya proses itu masih belum benar-benar jelas.

Uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan hasil signifikan ( $p = 0.009$ ). Hasil ini menunjukkan bahwa paling tidak ada perbedaan persentase area antara kontrol dan ketiga dosis. Setelah uji *Kruskal-Wallis* dilakukan uji *Post Hoc*-nya yaitu *Mann-Whitney*, agar diketahui kelompok mana yang memiliki perbedaan persentase area yang bermakna. Pada hasil uji *Mann-Whitney* didapatkan adanya perbedaan persentase area VEGFR-2 antara kelompok A dengan B signifikan ( $p = 0.048$ ), kelompok A dengan C signifikan ( $p = 0.003$ ), dan kelompok A dengan D signifikan ( $p = 0.009$ ).

#### 6.4 Implikasi Terhadap Bidang Kedokteran

Quercetin adalah antioksidan flavonoid yang ditemukan dalam buah-buahan dan sayuran berpigmen. Buah dan sayur seperti jeruk, apel, peterseli, anggur merah serta teh, semuanya mengandung quercetin (Stone, 2011). Quercetin telah diketahui sebagai antihistamin, antiinflamasi, perlindungan terhadap penyakit jantung dan kanker, 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 (Landsman, 2011; Pratheeshkumar *et al*, 2012). Efek lainnya adalah penghambatan sekresi protein VEGF, inhibitor VEGFR-2, dan penghambatan sintesis protein H-ras (Lee, 2009; Kong *et al*, 2005).

akanan (seperti banyak vitamin) telah terbukti aman untuk ibu hamil. Akan tetapi, tidak ada informasi yang cukup untuk mengetahui apakah suplemen quercetin aman bagi wanita hamil atau janin yang sedang berkembang (Monson & Schoenstadt, 2013). Oleh karena itu, dikarenakan pentingnya masa kehamilan bagi seorang ibu dan pentingnya vaskulogenesis dan angiogenesis yang baik bagi perkembangan janin, maka penelitian ini dilaksanakan untuk mengetahui pengaruh pemberian quercetin pada embrio.

Pada penelitian ini, quercetin diketahui dapat mempengaruhi terjadinya malformasi, gangguan pertumbuhan dan perkembangan, dan bahkan kematian embrio melalui penghambatan proses vaskulo-angiogenesis. Maka, quercetin dapat memberi dampak terhadap terjadinya kelainan kongenital atau bahkan kematian pada janin. Oleh karena itu, peneliti menganjurkan untuk mengurangi konsumsi berlebih dari quercetin saat hamil, oleh karena adanya potensi penghambatan vaskulo-angiogenesis oleh quercetin.

### 6.5 Keterbatasan Penelitian

Penelitian dengan menggunakan embrio ayam ini menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* dengan eksperimental murni. Memiliki tujuan untuk mengamati *survival rate*, morfologi, dan persentase area pada embrio ayam umur 48 jam. Penelitian ini menggunakan sampel sesuai rumus Steell dan Torrie dengan jumlah sampel minimal masing . masing 7 butir telur ayam. Berdasarkan penelitian yang sudah terlaksana, peneliti menemukan hambatan-hambatan yang dapat dievaluasi dan dijadikan bahan pertimbangan dalam melaksanakan penelitian lanjutan.

pengamatan morfologi dan distribusi VEGFR-2

dilakukan dengan pengecatan imunohistokimia. Jarangnya penelitian dengan pengecatan imunohistokimia pada embrio ayam membuat peneliti kesulitan mencari laboratorium yang dapat memenuhi pengecatan ini. Jika pencucian kurang bersih juga didapatkan gambaran dan persebaran antibodi yang kurang baik. Sebelum dilakukan imunohistokimia, embrio ditempel dengan albumin. Penempelan *whole mount* embrio ini tidak seperti jaringan lain, jadi mudah terlepas ketika dicuci. Hambatan ini ditemui saat imunohistokimia ketika embrio terlepas dan harus hati-hati melakukan pengecatan. Pada proses pencucian imunohistokimia juga dapat terjadi embrio terlipat, pecah maupun hilang sebagian tubuhnya. Oleh karena itu, diperlukan penelitian dengan menggunakan metode lain yang lebih sesuai untuk pengamatan morfologi dan persebaran VEGFR-2 pada sediaan *whole mount* embrio ayam.

Hambatan lain juga ditemui melalui proses penghitungan dengan stereologis pada embrio. Terbatas karena menggunakan metode manual, yang rawan terjadi bias. Karena itu digunakan metode penghitungan dengan 3 orang, yang dapat mengurangi bias.

Keterbatasan lain adalah hasil penelitian ini belum bisa digeneralisasikan pada embrio manusia dari aspek dosis yang digunakan oleh karena penelitian ini menggunakan embrio ayam, dan pemberian quercetin langsung kepada embrio. Faktor ibu (dari embrio manusia) juga memiliki peran dalam hal ini. Faktor ini dapat berupa metabolisme obat dalam tubuh ibu, maupun *barrier* plasenta. Sepanjang kehamilan, plasenta menyediakan penghalang transfer dari ibu ke janin untuk sebagian besar bahan asing bagi tubuh (Menjoge, 2011). Adanya faktor ibu ini dapat menimbulkan pengaruh pada proses farmakokinetik quercetin terhadap embrio.



**PDF**  
Complete

*Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

status gizi juga dapat mempengaruhi, walaupun

kemampuan quercetin untuk melintasi plasenta dan terakumulasi pada janin juga tetap harus menjadi perhatian (Vanhees, 2011).

