

MEMPELAJARI AKTIVITAS ANTI ANGIOGENESIS DARI SIRIP DADA IKAN HIU PUTIH (*Carcharhinus dussumieri*)

Hardoko

Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya

ABSTRACT

The antiangiogenic activity research from crude extract and protein fraction of pectoral fin white shark (*Carcharhinus dussumieri*) by CAM (Chick Chorioallantoic Membrane) methods was done. The result showed that crude extract and protein fraction of dorsal fin of white shark had an effect as antiangiogenic activity. Crude extract had higher activity than protein fraction. The inhibition responses increased with increasing concentration.

Key words : antiangiogenic; pectoral fin.

ABSTRAK

Penelitian tentang aktivitas anti-angiogenesis dari ekstrak kasar dan fraksi protein dari sirip dada ikan hiu putih (*Carcharhinus dussumieri*) telah dilakukan dengan menggunakan metode CAM (Chick Chorioallantoic Membrane). Hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak kasar dan fraksi protein dari sirip dada ikan hiu putih mempunyai aktivitas anti-angiogenesis. Ekstrak kasar mempunyai aktivitas lebih tinggi daripada fraksi proteinnya. Aktivitas penghambatannya meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi yang digunakan.

Kata kunci: anti-angiogenesis; sirip dada

PENDAHULUAN

Ikan hiu putih (*Carcharhinus dussumieri*) merupakan salah satu jenis ikan hiu yang banyak tertangkap di perairan utara Pulau Jawa. Menurut Compagno dan Djuanda jenis ikan hiu didunia mencapai 350 spesies dan sekitar 20 diantaranya terdapat di perairan Indonesia (1,2).

Ikan hiu tersebut ditangkap terutama untuk diambil siripnya karena mempunyai nilai ekonomi yang tinggi. Selama bertahun-tahun bangsa Cina telah memanfaatkan sirip ikan hiu sebagai menu makanan sehari-hari dan menyajikannya dalam bentuk sup. Adapun bagian sirip yang sering dijadikan sup adalah sirip punggung, sirip dada, dan sirip ekor bagian bawah (3).

Nilai ekonomi yang tinggi dari sirip ikan hiu tersebut barang kali terkait dengan: 1) Rasa yang enak dan spesifik karena kandungan tulang rawannya, seperti yang dikemukakan Steel (4) bahwa ikan hiu termasuk hewan bertulang rawan yang paling tinggi kadarnya dibandingkan hewan yang lain. Tulang rawan hiu tersebut bersifat elastis, semi transparan, dan tersusun dari protein. 2) Sirip ikan hiu dipercaya mempunyai bermacam-macam khasiat sebagai obat awet muda dan obat kanker / tumor (3).

Khasiat obat dari sirip ikan hiu dikaitkan dengan adanya zat aktif pada tulang rawannya. Bukti ilmiah, mula-mula oleh Langer R yang melaporkan bahwa tulang rawan mempunyai daya anti neovaskularisasi (5), dan kemudian Maugh TH melaporkan bahwa tulang rawan dari tulang belikat anak sapi

dapat menghambat angiogenesis tumor (6). Angiogenesis adalah proses pembentukan pembuluh darah baru yang dalam tumor berguna untuk memasok nutrisi bagi pertumbuhan tumor. Selanjutnya Lee A melaporkan bahwa tulang rawan dari ikan hiu kepala martil (*Cetorhinus maximus*) juga mengandung zat anti angiogenesis yang dapat menghambat pertumbuhan tumor kornea kelinci (7). Dengan demikian ada dugaan bahwa ikan hiu jenis yang lain juga mempunyai aktivitas anti angiogenesis meskipun mungkin kadarnya yang berbeda.

Karena hasil sirip ikan hiu di Indonesia cukup banyak dan diekspor ke berbagai negara yang pada tahun 1998 ekspornya mencapai 95.502.000 kg (8), maka perlu diketahui kemampuan anti angiogenesisnya atau kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan tumor, sehingga nilai ekonomi dan manfaatnya dapat semakin ditingkatkan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas anti angiogenesis dari ekstrak kasar dan fraksi protein sirip dada ikan hiu putih yang diukur menggunakan metode CAM (*Chick Chorioallantoic membrane*). Menurut (9) metode CAM merupakan metode yang paling umum digunakan untuk menyelidiki efek anti angiogenesis dan yang paling mudah dilakukan.

MANFAAT PENELITIAN

Penelitian ini masih bersifat penelitian dasar yang dapat digunakan untuk penelitian lebih lanjut. Hasil penelitian ini

diharapkan dapat dimanfaatkan dibidang kedokteran khususnya dalam rangka penyembuhan penyakit tumor (solid tumor) melalui mekanisme penghambatan pembentukan pembuluh darah baru (anti-angiogenesis) pada tumor.

MATERI DAN METODE

BAHAN

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari sirip dada ikan hiu putih yang masih segar dan berukuran 10-17 cm, bahan kimia untuk mengolah sirip (asam asetat 15%), bahan untuk pembuatan ekstrak kasar sirip (akuades), bahan untuk pembuatan fraksi protein sirip (buffer fosfat pH 7.4, amonium sulfat 85%, larutan NaCl 0.1%, dan reagen Nessler), bahan-bahan kimia untuk analisis protein, bahan untuk uji CAM (telur ayam bangkok fertil, akuades, dan buffer fosfat).

METODE

Penelitian ini dilakukan melalui tahapan pengolahan sirip, pembuatan ekstrak kasar, pembuatan fraksi protein, uji CAM.

a. Proses pengolahan sirip ikan hiu

Pengolahan sirip ikan hiu didasarkan pada metode Wibowo S dan H Susanto dengan sedikit modifikasi. Mula-mula sirip dada ikan hiu direndam dalam larutan asam asetat 15% selama 2 hari, kemudian dilakukan pembersihan dari sisa kulit dan daging, penghancuran dengan blender dan dilanjutkan dengan pengeringan dalam artificial dryer pada suhu 40°C. Setelah kering hancuran sirip lebih dihaluskan lagi dengan blender dan diayak dengan ayakan mesh 1mm. Serbuk yang dihasilkan dimasukkan dalam toples tertutup rapat dan disimpan dalam freezer sampai saat digunakan (10).

b. Pembuatan ekstrak kasar

Mula-mula serbuk sirip dilarutkan dalam akuades dengan perbandingan 1:4 (b/v), kemudian dipanaskan dalam penangas air (water bath) suhu 60°C selama 2 jam sambil sesekali diaduk. Setelah itu, larutan disaring dan filtratnya dikeringkan pada suhu 50°C sehingga diperoleh ekstrak kasar kering dan kemudian dihaluskan dengan mortar.

c. Pembuatan fraksi protein

Pembuatan fraksi protein ini menggunakan metode pengendapan protein dengan amonium sulfat jenuh. Mula-mula serbuk sirip direndam dalam buffer fosfat sampai larut benar, kemudian disaring dengan kertas saring S & S halus. Cairan yang diperoleh, dijemuhkan dengan amonium sulfat 85%. Dalam penelitian ini, volume filtrat yang dijenuhkan sebanyak 3000 ml dan dapat diendapkan secara sempurna dengan penambahan amonium sulfat sebanyak 780 ml. Larutan dibiarkan sekitar 10 menit dan sesekali diaduk. Selanjutnya larutan disentrifugasi dengan kecepatan 20.000 x g selama 10 menit. Pelet atau endapan yang diperoleh dilarutkan kembali dengan larutan NaCl 0.1% dan didialisis terhadap akuades pada suhu 2-4°C untuk menghilangkan amonium sulfat yang terikut, kemudian disentrifugasi lagi selama 10 menit dengan kecepatan 20.000 x

g. Supernatan yang diperoleh dikeringkan pada suhu 50°C dan diperoleh serbuk fraksi protein.

d. Uji CAM

Uji CAM ini didasarkan pada metode yang dikutip oleh Lane IW dan L Comac. Mula-mula telur ayam bangkok fertil diinkubasi selama 4.5 hari pada suhu 40°C, kemudian telur dipecah kulitnya secara hati-hati pada bagian ujung telur yang ada kantong udaranya sehingga terlihat adanya selaput Chorioallantoic embryo ayam. Selaput tersebut secara hati-hati dipindahkan dalam petri steril dan ditemeli cakram aluminium steril berdiameter 1 cm. Selanjutnya selaput tersebut ditetesi pada bagian dalam cakarannya dengan larutan ekstrak kasar atau fraksi protein yang telah disterilkan dengan millipore, sesuai dengan perlakuan konsentrasinya sebanyak 2 tetes (0.06 ml). Konsentrasi ekstrak kasar atau fraksi protein yang diujikan masing-masing adalah 500 ppm, 1000 ppm, dan 1500 ppm menggunakan buffer fosfat. Selaput chorioallantoic embryo ayam yang telah diberi perlakuan secara aseptis diinkubasi pada suhu 32-35°C dan diamati perkembangannya setiap 4 jam. Dalam penelitian ini digunakan kontrol selaput chorioallantoic embryo ayam yang ditetesi larutan buffer fosfat. Beberapa contoh atau sampel selaput chorioallantoic diambil gambarnya menggunakan kamera mikro merk Wild Heerbrugg M3 Switzerland dengan perbesaran 96 x.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis kadar protein dan kadar air dari serbuk sirip hiu awal hasil proses pengolahan diperoleh mengandung protein 81,64% dengan kadar air 5.79%, sedang ekstrak kasar mengandung protein 86.84% dengan kadar air 7.05%, dan fraksi protein mengandung protein 92.75% dengan kadar air 5.72%. Hal tersebut menunjukkan adanya peningkatan kadar protein dari bahan awal ke fraksi protein.

Hasil pengamatan daya hambat pembentukan pembuluh darah baru (anti angiogenesis) pada selaput khorioallantois embryo ayam dapat dilihat pada Tabel 1, sedangkan beberapa contoh foto selaput chorioallantoic embryo ayam kontrol, tingkat penghambatan rendah, tingkat penghambatan sedang, dan tingkat penghambatan berat, masing-masing dapat dilihat pada Gambar 1A, Gambar 1B, Gambar 1C, dan Gambar 1D.

Dari Gambar 1B, Gambar 1C, dan Gambar 1D menunjukkan tidak adanya pertumbuhan atau menghilangnya pembuluh-pembuluh darah baru yang semakin banyak dengan semakin meningkatnya konsentrasi sampel (ekstrak kasar atau fraksi protein) yang ditetaskan dibandingkan dengan kontrol. Tidak adanya pertumbuhan atau menghilangnya pembuluh-pembuluh darah pada selaput atau membran khorioallantois mengindikasikan adanya aktivitas penghambatan pembentukan atau pertumbuhan pembuluh-pembuluh darah dari sampel yang ditetaskan. Apabila daya penghambatan dan penghilangan pembuluh darah baru tersebut dikaitkan dengan pertumbuhan tumor padat (solid tumor) maka dapat dianalogkan dengan adanya pembentukan pembuluh darah baru pada tumor terhambat dan pembuluh darah yang ada makin mengecil sehingga suplai nutrisi bagi tumor akan terhenti dan tumor lama

kelamaan akan mati. Mekanisme penghambatan tersebut merupakan mekanisme penghambatan tumor sebagaimana yang dikemukakan (3).

Dari Tabel 1 terlihat bahwa daya hambat ekstrak kasar sirip dada hiu putih lebih tinggi daripada fraksi proteinnya, seperti ditunjukkan pada waktu dan konsentrasi yang sama (misalnya waktu 8 jam, konsentrasi 1500 ppm). Daya hambat yang lebih tinggi dari ekstrak kasar juga ditunjukkan dari waktu penghambatannya yang lebih cepat (misal pada konsentrasi 500 ppm, ekstrak kasar mulai menghambat pada jam ke 12, sedangkan fraksi protein mulai menghambat pada jam ke 16). Adanya daya hambat yang lebih tinggi dari ekstrak kasar juga dilaporkan oleh Dupont E pada tulang rawan ikan hiu jenis yang lain (11).

Adanya daya penghambatan dari fraksi protein sirip ikan hiu putih (Tabel 1) mengindikasikan bahwa zat aktif yang dapat menghambat angiogenesis adalah berupa senyawa protein. Hal yang senada juga dilaporkan oleh Dupont E, dan Lane IW. Adanya daya hambat dari ekstrak kasar sirip hiu putih yang lebih tinggi dari pada fraksi proteinnya menunjukkan bahwa penghambatan angiogenesis sinergis dengan senyawa lain (11,3). Menurut Lane IW dan Anonimous, senyawa lain yang bersifat sinergis dalam penghambatan pembentukan pembuluh darah baru salah satunya adalah senyawa karbohidrat yang ada pada tulang rawan (3,12).

Dari Tabel 1 juga menunjukkan adanya penghambatan yang semakin meningkat dengan meningkatnya konsentrasi sample, baik pada sampel ekstrak kasar maupun sampel fraksi protein sirip ikan hiu putih. Perlakuan konsentrasi 1500 ppm cenderung memberikan tingkat penghambatan berat / tinggi, sedang perlakuan 1000 ppm cenderung memberikan tingkat penghambatan sedang, dan perlakuan konsentrasi 500 ppm cenderung memberikan tingkat penghambatan rendah (Lihat Gambar 1). Menurut Dupont dan Lane IW peningkatan penghambatan pembentukan pembuluh darah baru terkait dengan peningkatan kandungan proteinnya (3,11).

KESIMPULAN

Sirip dada ikan hiu putih mengandung protein dan senyawa lain yang mempunyai daya anti angiogenesis pada selaput chorioallantoic embrio ayam.

Ekstrak kasar sirip ikan hiu putih mempunyai daya antiangiogenesis lebih tinggi dari pada fraksi proteinnya.

Semakin tinggi konsentrasi ekstrak kasar ataupun fraksi proteinnya daya antiangiogenesisnya juga meningkat.

DAFTAR PUSTAKA

1. Compagno LJV. Shark The World. United Nation Development Programme FAO. Rome. 1984, 4: 54-55.
2. Djuanda T. Dunia Ikan. PT. Armico. Bandung. 1981: 20-21.
3. Lane IW dan L. Comac. Shark Don't Get Cancer. McGraw Hill Book Co. Inc. New York. 1992: 29-31, 49-54
4. Steel R. Shark of the World. Blanford Press. London. 1998: 78
5. Langer R, H Brem, K Falterman, M Klein dan J Folkman. Isolation of A Cartilage Factor That Inhibit Tumor Neovascularization. Science. 1976, 193: 70-71.
6. Maugh TH. Angiogenesis Inhibitor Link Many Diseases. Science. 1981, 212: 1374-1375.
7. Lee A dan R Langer. Shark Cartilage Contains Inhibitors of Tumor Angiogenesis. Science. 1983, 221: 1185-1187.
8. Anonimous^{a)}. Ekspor Sirip Ikan Hiu dari Indonesia. Laboratorium Pembinaan dan Pengujian Mutu Hasil Perikanan (LPPMHP). 2000: 7
9. Noble D. Shark Cartilage/Cartilate/Cartilade/Benefit/AE-94/Neovastat.BC Cancer Agency. Vancouver. Canada. <http://www.bccancer.bc.ca/uct/sharkcartilage-cartilate-cartilade-benefit-ae-94-neovastat.shtml-26k>. 2000: 1-3.
10. Wibowo, S. dan H. Susanto. Sumberdaya dan Pemanfaatan Ikan Hiu. Penebar Swadaya, Jakarta. 1995: 10-11.
11. Dupont E, PE Savard, C Jourdain, C Juneau, A Thibodeau, N Ross, K Marenus, DH Maes, G Pelletier and DN Sounder. Antiangiogenic Properties of A Novel Shark Cartilage Extract. Journal of Cutaneous Medicine and Surgery. 1998, 2 (3): 146-147.
12. Anonimous^{b)}. How Shark Cartilage Works. Better U for Health. Canada. <http://better-u.com/shark-cartilage-cancer-links.html-5k>. 2000: 1-2.

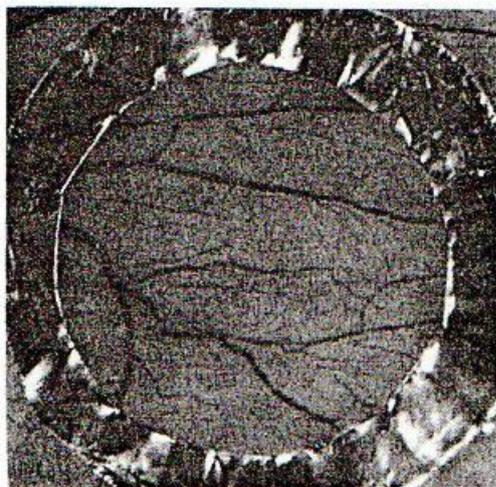
Lampiran 1 Mempelajari Aktivitas Anti Angiogenesis dari Sirip Dada Ikan Hiu Putih (*Carcharhinus dussumieri*)

Tabel 1. Hasil pengamatan penghambatan angiogenesis pada selaput chorioallantois embrio ayam.

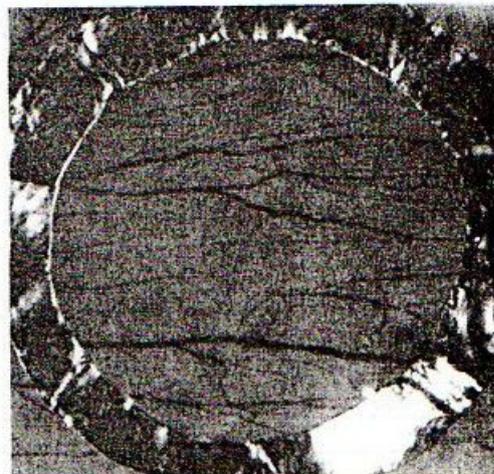
Jenis Sampel	Konsentrasi (ppm)	Ulangan	Waktu (Jam) dan Hasil Pengamatan					
			4	8	12	16	20	24
Fraksi Protein	1500	1	-	++	++	+++	*	*
		2	-	++	+++	*	*	*
		3	-	++	+++	*	*	*
		4	-	++	+++	*	*	*
	1000	1	-	-	++	++	++	*
		2	-	-	++	++	++	*
		3	-	-	+	++	++	*
		4	-	-	+	++	++	*
	500	1	-	-	-	+	+	+
		2	-	-	-	+	+	+
		3	-	-	-	+	+	+
		4	-	-	-	+	+	+
Ekstrak Kasar	1500	1	-	+++	*	*	*	*
		2	-	+++	*	*	*	*
		3	-	+++	*	*	*	*
		4	-	+++	*	*	*	*
	1000	1	-	-	++	+++	*	*
		2	-	-	++	++	*	*
		3	-	-	++	++	*	*
		4	-	-	++	++	*	*
	500	1	-	-	-	+	+	+
		2	-	-	+	+	+	+
		3	-	-	+	+	+	+
		4	-	-	+	+	+	+
Kontrol		1	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-

Keterangan : +++ : terjadi penghambatan angiogenesis berat
 ++ : terjadi penghambatan angiogenesis sedang
 + : terjadi penghambatan angiogenesis ringan
 - : tidak terjadi penghambatan angiogenesis
 * : embrio ayam mati

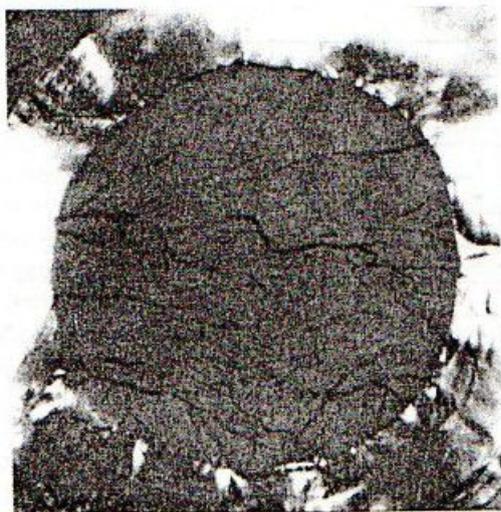
Lampiran 2. Mempelajari Aktivitas Anti Angiogenesis dari Sirip Dada Ikan Hiu Putih (*Carcharhinus dussumieri*)



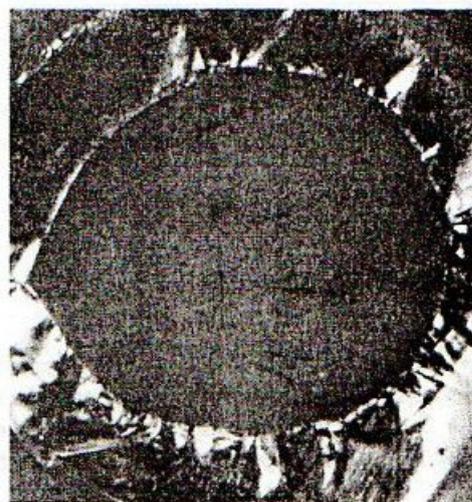
A. Tidak ada aktivitas antiangiogenesis (kontrol)



B. Ada aktivitas antiangiogenesis ringan



C. Ada aktivitas angiogenesis sedang



D. Ada aktivitas angiogenesis berat

Gambar 1. Hasil pengamatan tingkat penghambatan antiangiogenesis pada selaput khorioallantois embrio ayam