

Aktivitas Sitotoksik dan Antiangiogenesis Ekstrak Fraksi Umbi Mentimun Papanas (*Cocconia grandis* (L.) Voigt) Terhadap Sel Kanker Payudara T47D Dan *Chorio Allantoic Membrane* (CAM) Embrio Ayam yang Diinduksi bFGF

Agustinus Alfred Seran¹, Jason M. Peranginangin¹, Rizal M. Rukmana²

¹Program Studi S2 Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta,

²Program Studi Analisis Kesehatan, Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Setia Budi Surakarta

e-mail : alfredagustinus16@gmail.com ; Jason.merari@yahoo.com ; rizal.nerazuri@gmail.com

(Article History: Received 07-01-2020; Accepted 28-04-2020; Published 30-04-2020)

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik dan antiangiogenesis ekstrak dan fraksi umbi mentimun papanas (*Cocconia grandis* (L.) Voigt) terhadap sel kanker payudara T47D dan *Chorio Allantoic Membrane* (CAM) embrio ayam yang diinduksi protein bFGF. Ekstrak diperoleh melalui metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak etanol selanjutnya difraksinasi dengan metode partisi cair-cair. Fraksi yang diperoleh dilakukan analisis kualitatif dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Dari analisis KLT menunjukkan bahwa terdapat beberapa golongan senyawa aktif yaitu alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan terpen. Uji sitotoksik dilakukan menggunakan sel kanker payudara T47D dan sel VERO dengan metode MTT assay kemudian dibaca absorbansinya pada ELISA reader dengan parameter pengamatan nilai IC₅₀. Uji antiangiogenesis dilakukan menggunakan metode *Chorio Allantoic Membrane* (CAM) embrio ayam yang diinduksi protein bFGF dengan parameter pengamatan jumlah pembuluh darah baru. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air memiliki nilai IC₅₀ berturut-turut adalah 500,167; 353,131; 109,975; dan 303,990 µg/mL. Fraksi etil asetat memiliki nilai IC₅₀ paling kecil sehingga dilanjutkan ke uji antiangiogenesis. Fraksi etil asetat memiliki aktivitas antiangiogenesis terhadap *Chorio Allantoic Membrane* (CAM) dengan konsentrasi efektif sebesar 219,95 µg/mL ditandai dengan persentase penghambatan angiogenesis sebesar 56,78%.

Kata kunci: Antiangiogenesis; *Chorio Allantoic Membrane* (CAM); mentimun papanas (*Cocconia Grandis* (L.) Voigt); Sitotoksik; T47D

Cytotoxic Activity and Antiangiogenesis of Extract Fraction of *Cocconia grandis* (L.) Voigt) Base Towards T47D Breast Cancer Cells and *Chorio Allantoic Membrane* (CAM) of Chicken Embryo Induced by bFGF

ABSTRACT

This study aims to identify the cytotoxic activity and antiangiogenesis of extract and fraction of (*Cocconia Grandis* (L.) Voigt) base towards T47D breast cancer cells and *Chorio Allantoic Membrane* (CAM) of chicken embryo induced by bFGF. The extract was extracted through maceration method with ethanol 96% soluble. The ethanol extract was then fractionated by the liquid-liquid partition method. The fractions obtained were analyzed qualitatively by the thin layer chromatography (TLC) method. The TLC analysis shows that there are several classes of active compounds, namely alkaloids, flavonoids, tannins, saponins and terpenes. The ethanol extraction was then fractionated using the liquid-liquid extraction. The cytotoxic test was conducted using the T47D breast cancer cells and VERO cells with the MTT assay method which their absorbance were read on ELISA reader with the value of observation parameters IC₅₀. The antiangiogenesis test was conducted using the *Chorio Allantoic Membrane* (CAM) method of chicken embryo induced with bFGF protein with the new blood vessels count as the observation parameters. The results showed

that the extract, n-hexane fraction, ethyl acetate fraction, and water fraction had IC₅₀ values of 500.167; 353.131; 109.975; and 303.990 µg/mL, respectively. Ethyl acetate fraction has the smallest IC₅₀ value so it is continued to the antiangiogenesis test. Ethyl acetate fraction had an antiangiogenesis activity towards Chorio Allantoic Membrane (CAM) with the effective concentration 219,95 µg/mL marked by the angiogenesis inhibitors percentage of 56,78%.

Keywords: Antiangiogenesis; *Chorio Allantoic Membrane* (CAM); *Coccinia grandis* (L.) Voigt; cytotoxic; T47D

PENDAHULUAN

Penelitian terhadap penanganan kanker sekarang ini mulai diarahkan pada pengujian potensi bahan alam sebagai agen kemopreventif yang berpotensi sebagai agen pendamping kemoterapi. Tujuannya adalah untuk meningkatkan sensitifitas sel kanker serta mengurangi efek samping yang ditimbulkan oleh agen kemoterapi (Adelina *et al.*, 2014).

Tanaman mentimun papasan (*Coccinia grandis* (L.) Voigt) merupakan salah satu tanaman asli Nusa Tenggara Timur (NTT) yang secara empiris digunakan untuk mengobati demam pada anak, mengobati gatal-gatal pada kulit, dan juga untuk mengobati atau menurunkan gula darah. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui aktivitas tanaman mentimun papasan ini, beberapa diantaranya adalah antimikroba, antidiabetes dan antikanker. Penelitian terkait kandungan kimia dari bagian-bagian tumbuhan ini juga telah dilakukan oleh (Nagare *et al.*, 2015) yang mengatakan bahwa daun dan batang mengandung senyawa sitosterol, cephalandrol, cephalandrine A & B, heptacosane. Akar mengandung senyawa alkaloid, amirin sitosterol, asam karbonat, saponin, Coccinoside, flavonoid, lupeol, resin. Buah mengandung amirin asetat, sitosterol, carotene, cucurbitacin B, lycopene, lupeol, taraxerol, taraxerone. Sedangkan pada biji mengandung minyak lemak terutama ester linoleat, oleat dan asam palmitat.

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh (Sathees & Muruga, 2011) dari College University Kerala India, mengatakan bahwa daun tanaman mentimun papasan memiliki aktivitas antimikroba. Penelitian lain juga telah dilakukan oleh (Munasinghe *et al.*, 2011) dari Fakultas Kedokteran Universitas Kelaniya Sri Lanka dalam studi klinis dengan pemberian daun mentimun papasan pada pasien penderita diabetes melitus mengatakan

bahwa kadar gula darah secara keseluruhan pada kelompok eksperimen secara signifikan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Telah dilaporkan sebelumnya oleh (Churiyah & Harran, 2010) dari Departemen Biologi Fakultas MIPA Institut Pertanian Bogor, bahwa fraksi protein bioaktif dari buah matang, buah belum matang dan akar mentimun papasan dalam uji toksisitas terhadap galur sel kanker menunjukkan bahwa semua fraksi protein bioaktif dari ketiga protein yang dihasilkan, beracun pada BSLT dengan LC₅₀ dalam kisaran 23-32 µg/mL. Uji sitotoksik dari fraksi protein buah yang belum matang menggunakan galur sel kanker menunjukkan bahwa protein ini dapat menghambat proliferasi sel hela hingga 34,4% dan sel K-562 hingga 40,98%. Selain itu penelitian lain terkait aktivitas *in vitro* dan *in vivo* terkait aktivitas antikanker juga telah dilaporkan oleh (Bhattacharya *et al.*, 2011) dari Departemen Teknologi Farmasi Universitas Jadavpur India, mengatakan bahwa ekstrak etanol daun mentimun papasan pada parameter *in vitro* dan *in vivo* memiliki aktivitas antikanker terhadap sel EAC sehingga senyawa terisolasi dari ekstrak etanol dapat digunakan untuk desain rasional obat antikanker. Oleh karena itu, akan dilakukan penelitian untuk menguji aktivitas sitotoksik umbi tanaman mentimun papasan (*Coccinia grandis* (L.) Voigt) terhadap sel kanker T47D serta ingin mengetahui efek antiangiogenik terhadap *Chorioallantoic membrane* (CAM) yang diinduksi protein bFGF.

METODE PENELITIAN

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Parasitologi Fakultas kedokteran dan laboratorium Anatomi Hewan Fakultas

Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta pada bulan Mei - November 2019.

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Penelitian ini dilakukan untuk melihat aktivitas sitotoksik dan antiangiogenesis ekstrak dan fraksi-fraksi umbi mentimun papasan (*Coccinia grandis* (L.) Voigt) pada kultur sel kanker payudara T47D dan *Chorio Allantoic Membrane* (CAM) embrio ayam yang diinduksi protein bFGF. Aktivitas sitotoksik dilakukan dengan metode MTT Assay sedangkan pengamatan angiogenesis dilakukan dengan menggunakan metode CAM.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, di antaranya: alat penyari terdiri atas bejana maserasi, kain flanel, ayakan no. 40, batang pengaduk, blender, corong pisah, klem & batang statip, *moisture balance* O'haus MB23, kertas saring, eksikator, timbangan elektrik, corong Buchner, oven, evaporator dan alat gelas. Alat uji sitotoksik meliputi tangki nitrogen cair, *sentrifuge* Sigma 3K12 (B. Braun Biotech Internasional), *autoclave*, inkubator 37°C aliran CO₂ 5% model 6200 (Napco), *laminar air flow class II* (Labconco), spektrokolorimeter pada alat ELISA reader (SLT 240 ATC), *Nebauer haemocytometer* (Olympus CKX41), tabung konikal steril (Nunclone), *tissue culture flask* (Nunclone), *mikroplate* 96 sumuran (Nunclone), lampu ultraviolet, neraca elektrik (Sartorius), mikropipet 20-200 µL dan 200-1000 µL (Pipetman), mesin *vortex*, mikroskop *inverted* (Axiovert-25), *magnetic stirrer* dan kamera digital, pinset, gunting, minidril, dan inkubator embrio

Bahan yang digunakan adalah serbuk umbi mentimun papasan (*Coccinia grandis* (L.) Voigt) dan ekstraksi menggunakan etanol 96%, serta pelarut *n* heksana, etil asetat dan air untuk fraksinasi, sel kanker payudara *cell line*; T47D; media stok: DMEM (Gibco); media kultur sel: media DMEM (Gibco), NaHCO₃, *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% v/v (Gibco), Penisillin-Streptomisin (Penstep) 2% v/v (Gibco), *Fungizone* (Amphoterasin B) 0,5% v/v (Gibco), Dimetil sulfoksida (DMSO), Tripsin 0,5%, MTT 5mg/mL dalam PBS; media pencuci sel: larutan *Phospat*

Buffer Saline (PBS) pH 7,2; *Sodium Dodesil Sulfat* (SDS) 10% dalam HCl 0,1 N sebagai penghenti (*stopper*), telur ayam berembrio SPF, protein bFGF, NaCl fisiologis, formalin, aquadest, alkohol, *paper disc*, paraffin cair, plastik parafilm.

Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman mentimun papasan sesuai kepustakaan dan dibuktikan di laboratorium B2P2TOOT Tawangmangu.

Pembuatan Serbuk

Pembuatan serbuk umbi mentimun papasan dilakukan dengan cara digiling dan diblender kemudian diayak, dan hasil berupa serbuk kering yang disimpan dalam wadah kering serta tertutup rapat, kemudian dilakukan refluks dan penetapan susut pengeringan serbuk umbi mentimun papasan.

Pembuatan Ekstrak Etanol

Sebanyak 500 gram serbuk umbi mentimun papasan kemudian dimasukan kedalam wadah berwarna gelap lalu ditambahkan etanol 96% dengan perbandingan 1 : 10 selanjutnya direndam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk kemudian didiamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat dengan cara disaring, dekantasi atau filtrasi. Ulangi proses penyaringan sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan *vacumrotary evaporator* (suhu dijaga pada 50°C) sampai diperoleh ekstrak kental (Depkes RI, 2001).

Penetapan Susut Pengeringan

Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan metode gravimetrik. Alat yang digunakan adalah *Moisture Balance* dengan 3 kali replikasi. Caranya dengan memasukan 2 g serbuk umbi mentimun papasan dalam wadah yang sudah ditara. Wadah tersebut kemudian dimasukkan ke dalam alat *Moisture Balance*. Pengoperasian alat telah selesai jika alat tersebut berbunyi dengan ditandai adanya

bunyi tertentu, kemudian catat hasil susut pengeringan (dalam satuan %). Cara yang sama diulangi 2 kali (Depkes RI, 2001).

Penentuan Bobot Jenis

Bobot jenis ekstrak ditentukan terhadap hasil pengenceran ekstrak 10% dalam pelarut tertentu (etanol) dengan alat piknometer. Bobot jenis ekstrak ditentukan terhadap hasil pengenceran ekstrak 10% dalam pelarut etanol dengan alat piknometer kering, bersih dan telah dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan pada suhu 25°C, masukkan kedalam piknometer yang telah diisi hingga suhu 25°C (Depkes RI, 2001).

Penetapan Kadar Air

Menimbang sebanyak 1 gram ekstrak umbi mentimun papasan kemudian dimasukan kedalam labu alas bulat pada alat *sterling-bidwell* kemudian ditambahkan xylene sebanyak 100 ml dan panaskan sampai tidak ada tetesan air lagi kemudian dilihat volume tetesan tadi dan dihitung kadarnya dalam satuan persen (Depkes RI, 2001).

Pembuatan Fraksi

Ekstrak etanol umbi mentimun papasan sebanyak 10 gram dilarutkan sedikit dengan air panas, kemudian dipartisi dengan air 50 ml dan pelarut n-heksana 50 ml ke dalam corong pisah diulang sebanyak 3 kali. Fraksi n-heksana merupakan filtrat yang terletak diatas dan fraksi air merupakan filtrat yang terletak dibawah. Fraksi n-heksana dipisahkan dari fraksi air ditampung dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu penangas 50°C. Fraksi air sisa dari fraksi n-heksana kemudian difraksinasi kembali dengan pelarut etil asetat 50 ml menggunakan corong pisah proses ini diulang sebanyak 3 kali. Fraksi etil asetat merupakan filtrat yang terletak diatas dan fraksi air terletak dibawah. Fraksi etil asetat dipisahkan dari fraksi air kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu penangas 50°C. Filtrat sisa fraksinasi dengan etil asetat adalah fraksi air, yang kemudian dikentalkan dengan penangas air sampai kental.

Identifikasi kandungan senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

a. Identifikasi polifenol

Sampel ditotolkan pada lempeng Silika Gel 60 F254. Lempeng kemudian dimasukkan ke dalam bejana jenuh berisi fase gerak etil asetat : asam formiat : toluena : air (6:1,5:3:0,5) lalu dieluasikan hingga batas, lempeng dikeringkan dan diamati di bawah sinar UV. Deteksi senyawa polifenol dilakukan dengan pereaksi FeCl₃. Setelah dipanaskan selama 5 menit pada suhu 100°C akan terjadi fluoresensi hijau tua kehitaman pada UV 366 nm (Harborne, 1987).

b. Identifikasi tanin

Tanin diidentifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada fase diam silika gel 60 F254 dan dilusi dengan fase gerak yaitu kloroform, etil asetat dan asam formiat (0,5:9:0,5). Bercak diamati di bawah lampu UV 254 nm dengan pembanding tanin 10 mg/1 ml etanol. Hasil positif jika terjadi bercak hijau lembayung pada lempeng KLT.

c. Identifikasi flavonoid

Sampel ditotolkan pada lempeng Silika Gel F254. Lempeng kemudian dimasukkan ke dalam bejana jenuh berisi fase gerak etil asetat : asam formiat : asam asetat glasial : air (100:11:11:27) lalu dieluasikan hingga batas, lempeng dikeringkan dan diamati di bawah sinar UV. Deteksi senyawa flavonoid dilakukan dengan pereaksi sitroborat. Setelah dipanaskan selama 5 menit pada suhu 100°C akan terjadi fluoresensi kuning, kehijauan pada UV 366 nm (Harborne, 1987).

d. Identifikasi alkaloid

Sampel ditotolkan pada lempeng silika gel 60 F254, dimasukkan ke dalam bejana jenuh berisi fase gerak toluen : etil asetat : dietilamin (7:2:1), dieulasi hingga batas, diangkat dan dikeringkan, kemudian disemprot dengan pereaksi dragendorff. Senyawa alkaloid menggunakan Dragendorff memberikan warna orange atau coklat setelah dipanaskan selama 5-10 menit pada suhu 100°C. Hasil analisis menunjukkan bercak warna orange (Harborne, 1987).

Uji Aktivitas Sitotoksik

a. Pembuatan media stok dan media komplit DMEM

Media padat DMEM disiapkan, kemudian dimasukkan 950 mL *aquabidest* steril dalam gelas beker 1 liter di dalam LAF. Media bubuk dituang ke dalam *aquabidest* steril ke dalam gelas beker, aduk hingga rata. Bagian dalam pembungkus media bubuk dibilas dengan *aquabidest*, tuang cairannya kedalam gelas beker di atas. NaHCO_3 ditambahkan sebanyak 2,2 gram untuk setiap liter media yang dibuat, diaduk rata. *Aquabidest* steril ditambahkan hingga volume 1 liter. Media padat dan NaHCO_3 diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga semua dapat larut. *Adjusting* pH dilakukan (seharga 0,2-0,3 dibawah pH yang diinginkan) dengan menambahkan NaOH 1 N atau HCl 1 N. Filtrasi media dilakukan dengan menggunakan filter 0,2 mikron, tamping ke dalam botol duran 500 mL. Media diberi penanda dan simpan di kulkas dengan suhu 4°C. Pembuatan media komplit DMEM dibuat dari 100 mL DMEM stock ditambah *Fetal Bovine Serum* (FBS) sebanyak 10%, antibiotika penisillin-streptomisin 2% dan *Fungizone* (Amphoteresin) 0,5%.

b. Pengaktifan sel kanker payudara T47D

Sel yang inaktif diambil dari tangki nitrogen cair dan segera dicairkan dalam *water bath* (suhu 37°C) kemudian vial disemprot dengan etanol 70%. Di dalam LAF, sel kanker payudara T47D dimasukkan dalam tabung sentrifuge lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, endapan yang terbentuk ditambah media komplit DMEM dengan FBS 10%. Selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa *tissue culture flask* kecil (2-3 buah) dan diamati di bawah mikroskop untuk memperkirakan jumlah sel. Sel hidup kelihatan bulat, jernih dan bersinar. *Flask* dimasukkan dalam inkubator beraliran CO_2 5% pada suhu 37°C. Setelah 24 jam, medium diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen serta jumlahnya cukup untuk penelitian.

c. Pemanenan dan perhitungan jumlah sel

Media dalam *tissue culture flask* dibuang lalu dicuci dengan *Phosphat Buffer*

Saline (PBS) kurang lebih 7 mL sebanyak 2 kali. Kemudian ditambahkan tripsin $\frac{1}{2}$ dari jumlah PBS. Diinkubasi selama 3-5 menit, lalu diamati pelepasan sel dari dasar *flask* dengan mikroskop. Sel dipipet masuk ke *conical* steril, ditambah media penumbuh sebanyak 2-3 mL untuk menghentikan kerja tripsin. Sel dilakukan pencampuran dengan pipet sampai sel terlepas, kemudian diamati keadaan sel di mikroskop. Sel yang terlepas dipindahkan ke dalam tabung *conical* baru dan disisakan sedikit di dalam *flask* yang kemudian ditambahkan media kultur 2-3 mL, diresuspensikan. Suspensi sel diambil 10 μL dan dipipetkan ke hemositometer, kemudian sel dihitung di bawah mikroskop *inverted*.

d. Treatment sel (pemberian ekstrak dan MTT)

Sumuran-sumuran yang berisi sel tersebut ditambahkan 100 μL larutan uji yaitu ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air yang dilarutkan dalam pelarut DMSO, sehingga diperoleh kadar akhir sampel dengan variasi konsentrasi tertentu (100; 500; 250; 125; 62,5; 31,25;) $\mu\text{g/mL}$ tiap sumuran. Sebagai kontrol sel digunakan sel dengan penambahan media komplit DMEM. Sebagai kontrol media digunakan hanya larutan uji media komplit DMEM. Kemudian sel tersebut diinkubasi pada inkubator CO_2 5% pada suhu 37°C selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media masing-masing sumuran dibuang dengan cara *microplate* dibalikkan 180°C di atas tempat buangan kemudian *plate* ditekan untuk meniriskan sisa cairan. Setelah itu, ditambahkan 100 μL MTT 0,3% dalam PBS. *Microplate* diinkubasikan kembali selama 4 jam pada inkubator CO_2 5% pada suhu 37°C. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan berwarna ungu, sedangkan sel yang mati akan memberikan warna kuning. Untuk menghentikan reaksi antara sel dengan MTT serta melarutkan formazan maka ditambahkan 100 μL SDS 10% dalam 0,1 N HCl . *Plate* kemudian dibungkus dengan kertas aluminium foil, diinkubasikan semalaman pada suhu kamar, kemudian sel dikocok dengan *shaker* selama 10 menit. Serapan dibaca dengan menggunakan spektrofotometer pada alat ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm.

Hasil uji sitotoksik berupa respon serapan dikonversikan ke dalam persen kehidupan sel dengan persamaan sebagai berikut:

$$\% \text{ Sel hidup} = \frac{(\text{Abs. Perlakuan} - \text{Abs. Kontrol Media})}{(\text{Abs. kontrol sel} - \text{Abs. Kontrol Media})} \times 100\%$$

Dilanjutkan analisis untuk menentukan regresi linear antara log konsentrasi sampel uji (ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air umbi mentimun papasan) *versus* persen sel hidup menggunakan *Microsoft Excel 2010*, hingga akan didapatkan persamaan: $Y = a + bx$

Ket: $Y = \log$ konsentrasi sampel uji

$X = \%$ viabilitas sel

Hasil antilog x dari persamaan di atas, merupakan nilai IC_{50} . Analisis lanjutan untuk melihat adanya keefektifitasan pada ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air umbi mentimun papasan dilakukan analisis *Independent T-test* menggunakan SPSS versi 17.

Uji Aktivitas Antiangiogenesis

Preparasi bFGF yang digunakan sebanyak 25 mikro gram dibuat stok kadar 50 nano gram/mikro liter dengan menggunakan larutan tris-HCL 10 mM pH 7,5 kemudian diencerkan sehingga mendapatkan kadar 1 nano gram/ mikro liter. Preparasi bFGF dilakukan secara aseptis di dalam *laminar air flow*. Dosis bFGF untuk setiap telur perlakuan terinduksi adalah 10 nano gram (Sun *et al.*, 2004).

Fraksi etil asetat umbi mentimun papasan dilarutkan dengan DMSO-aquades 0,8% steril untuk kemudian dibuat seri kadar dan distrerilkan menggunakan mikrofilter. Preparasi dilakukan secara aseptis didalam *laminar air flow*.

Telur ayam SPF umur 8 hari (inkubasi) segera diinkubasikan lagi dalam inkubator laboratorium pada suhu $39^{\circ}C$. tahap awal yaitu dengan memberi tanda pada kerabang telur yang meliputi batas ruang udara, lokasi embrio dan daerah yang akan dibuat segiempat (jendela) berukuran 1×1 cm diatas embrio. Lokasi embrio diketahui melalui *candling* pada telur. Kerabang telur pada

bagian kutub yang mengandung udara dan kerabang diatas embrio disucihamakan dengan alkohol. Selanjutnya pada kedua daerah tersebut dibuat lubang kecil menggunakan sebuah *mini drill*.

Udara dari ruang udara diaspirasi atau disedot dengan bola karet sampai berpindah dari kutub ke kerabang bagian atas telur. Perlakuan ini dilakukan pada posisi horizontal di ruang gelap dan melalui *candling*, sehingga ruang udara buatan yang terbentuk diatas embrio dapat terlihat. Kerabang telur diatas embrio dipotong dengan gergaji atau (*mini drill*), untuk membuat lubang segiempat dengan luas 1 cm^2 . Melalui lubang ini bFGF dan larutan uji di implantasi kedalam membran korio alantois yang telah terbentuk, setelah sebelumnya telur disucihamakan lagi dan dimasukan dalam *laminar air flow* dengan posisi horizontal dengan ruang udara buatan terlentang dibagian atas. Subjek uji berupa telur yang dibagi dalam 8 kelompok. (Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari 5 telur).

1. Kelompok I adalah sebagai kontrol, untuk memastikan bahwa paper disc yang digunakan sebagai pembawa tidak berpengaruh pada membran korio alantois telur ayam.
2. Kelompok II adalah telur dengan implantasi paper disc yang telah ditambahkan 10 mikro liter bFGF 1 nano gram/mikro liter, sebagai kelompok kontrol bFGF untuk melihat pengaruh induksi bFGF terhadap angiogenesis.
3. Kelompok III adalah kelompok telur dengan implantasi paper disc yang berisi 10 mikro liter bFGF 1 nano gram/mikro gram + 10 ml pelarut DMSO 0,8% sebagai control bFGF + pelarut untuk mengetahui pengaruh pelarut terhadap angiogenesis pada membrane korio allantois.
4. Kelompok IV, V, VI, merupakan kelompok telur yang digunakan untuk melihat efek penghambatan fraksi etil asetat umbi mentimun papasan terhadap angiogenesis membrane korio allantois. Telur pada kelompok ini diberi implantasi dengan variasi konsentrasi 59,987 $\mu\text{g/ml}$, 109,975 $\mu\text{g/ml}$, dan 219,950 $\mu\text{g/ml}$.
5. Telur yang sudah diberi perlakuan kemudian diinkubasi dengan kelembaban relatif 60 % selama 3 hari pada suhu $38,5-39^{\circ}C$. telur kemudian dimatikan dengan cara disimpan kedalam lemari es selama 24

jam dengan suhu 4-5⁰ C dan dibuka (umur 12 hari) kemudian isi telur dikeluarkan. Telur dibuka dengan cara menggunting cangkang telur menjadi 2 bagian dari cangkang yang terdekat dengan rongga udara, setelah itu CAM yang melekat pada cangkang dicuci dengan larutan isotonis NaCl 0,9%.

Langkah terakhir adalah CAM yang didapatkan diamati secara makroskopis. Hasil pengamatan makroskopis difoto dengan kamera. Parameter yang diamati dalam penelitian adalah banyaknya pembuluh darah baru atau respon angiogenesis pada CAM setelah pemberian fraksi umbi mentimun papasan. Evaluasi efek antiangiogenesis secara makroskopik dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode

Jumlah pembuluh darah baru yang terbentuk pada membran korio alantois dihitung dan diolah sehingga diperoleh persentase pertumbuhan angiogenesis, selanjutnya dihitung nilai persentase penghambatan angiogenesis dengan persamaan:

$$\% \text{ penghambatan angiogenesis} = 100\% - \% \text{ pertumbuhan angiogenesis.}$$

Setelah diperoleh persentase pertumbuhan angiogenesis kemudian dilakukan perhitungan nilai persentase penghambatan angiogenesis dengan persamaan:

$$\% \text{ Pertumbuhan Angiogenesis} = \frac{\text{rata - rata } \sum \text{P. darah pada kel. perlakuan}}{\text{rata - rata } \sum \text{P. darah pada kontrol bFGF}} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengumpulan bahan, pengeringan, dan pembuatan serbuk

Umbi tanaman mentimun papasan yang akan digunakan merupakan umbi dengan ukuran besar berwarna putih dan memiliki tekstur kulit yang kasar, kemudian dilakukan sortasi kering terlebih dahulu, untuk memisahkan sampel dengan pengotor atau bagian tanaman lain yang terbawa bersama sampel. Proses pencucian bertujuan untuk menghilangkan sampel dengan tanah atau debu. Perajangan pada umbi mentimun papasan bertujuan untuk memperkecil ukuran

sampel sehingga mudah untuk dilakukan pengeringan. Proses pengeringan umbi mentimun papasan bertujuan untuk mencegah terjadinya proses kimiawi yang terjadi pada sampel dan mencegah sampel dari kerusakan akibat bakteri dan jamur.

Tabel 1. Hasil penimbangan sampel basah dan sampel kering dan rendemen

Sampel	Berat basah (g)	Berat kering (g)	Rendemen (%)
Serbuk umbi mentimun papasan	2.100	1000	47,61

Tabel 1 menunjukkan bahwa berat sampel basah umbi mentimun papasan yang didapat dari proses sebelumnya sekitar 2100 gram, sedangkan sampel kering yang didapat setelah proses pengeringan yaitu sebanyak 1000 gram dengan persen rendemen sebanyak 47,61%.

Serbuk umbi mentimun papasan yang diperoleh kemudian digunakan untuk proses ekstraksi. Metode ekstraksi pada penelitian ini adalah dengan menggunakan metode maserasi. Pelarut yang digunakan adalah etanol 96%. Wadah maserasi yang digunakan berkaca gelap agar terhindar dari sinar matahari langsung, sehingga senyawa-senyawa yang terkandung dalam tanaman tidak mengalami perubahan warna pada saat proses pemisahan. Proses maserasi dilakukan dalam keadaan tertutup agar etanol tidak menguap pada suhu kamar selama 5 hari. Maserat yang diperoleh dievaporator kemudian dipekatkan di dalam oven pada suhu 50⁰C hingga diperoleh ekstrak kental.

Tabel 2. Hasil pembuatan ekstrak etanol umbi mentimun papasan dan perhitungan persen rendemen ekstrak.

Sampel	Berat serbuk (g)	Eta-nol (ml)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
Serbuk umbi mentimun papasan	500	2500	97.65	19,53
	500	2500	99.27	19,85
Total	1000	5000	196.92	39,38

Tabel 2 dapat memperlihatkan hasil rendemen ekstrak umbi Mentimun Papasan

dengan persentasi rendemen 39,38%. Hasil rendemen yang tinggi menunjukkan bahwa senyawa-senyawa kimia yang dapat tersari dalam ekstrak juga cukup besar.

Tabel 3. Hasil penetapan kadar air ekstrak umbi Mentimun Papasan

Bobot ekstrak (g)	Skala terbaca (ml)	Kadar air (%)
20	1,8	9
20	1,7	8,5
20	1,6	8
Rata-rata	1,7	8,5

Tabel 3 menunjukkan hasil persentasi rata-rata kadar air ekstrak umbi Mentimun Papasan 8,5%. Nilai ini menunjukkan nilai ekstrak umbi mentimun papasan memenuhi syarat yaitu kurang dari 30% (Voigth., 1994). Prinsip penentuan kadar air dengan destilasi yaitu menguapkan air dengan pembawa cairan kimia yang mempunyai titik didih yang lebih tinggi dari pada air dan tidak dapat dicampur dengan air serta mempunyai berat jenis lebih rendah dari air, zat kimia yang digunakan dalam penelitian ini yaitu toluena. Toluena mempunyai berat jenis lebih ringan dari air.

Tabel 4. Hasil pembuatan fraksi *n*-heksana, etil asetat dan fraksi air umbi mentimun papasan

ekstrak (g)	fraksi <i>n</i> -heksan (g)	fraksi etil asetat (g)	fraksi air (g)
40	10,35	6,21	12,37
rendemen	25,87	15,52	30,92

Hasil rendemen fraksi *n*-heksan umbi mentimun papasan yang diperoleh adalah 25,87%, fraksi etil asetat yang diperoleh 15,52% dan fraksi air yang diperoleh 30,92%. Hasil fraksi air yang didapatkan lebih banyak dibandingkan fraksi yang lain karena sebagian besar senyawa yang terkandung dalam umbi mentimun papasan bersifat polar. Rendemen dari hasil setiap pelarut berbeda karena kemampuan dari masing-masing pelarut dalam menyari senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol umbi mentimun papasan berbeda (Tabel 4).

Pengujian sitotoksik yang dilakukan pada pengujian ini, yaitu jumlah sel kanker hidup dalam suspensi yang digunakan dalam kultur adalah $99,75 \times 10^4$ sel/ml. Sedangkan

jumlah sel VERO hidup dalam suspensi yang digunakan dalam kultur adalah $102,5 \times 10^4$ sel/ml. Kemudian dilakukan pengenceran suspensi untuk mendapatkan konsentrasi sel kanker payudara T47D dan sel VERO untuk 96 sumuran dimana tiap sumuran sebanyak 100 μ L/sumuran. Pada tahap kedua dilakukan *treatment* sampel menggunakan sampel uji ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air. DMSO berfungsi sebagai *buffer* agar fraksi dapat larut dengan baik. Pelarut DMSO (*dimetil sulfoksida*) digunakan secara luas untuk melarutkan senyawa polar maupun non polar dan tidak bersifat toksik. Seri konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2 μ g/mL. Sedangkan konsentrasi untuk fraksi-fraksi yang digunakan adalah 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,81 μ g/mL, dan konsentrasi doxorubicin adalah 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 μ g/mL (Tabel 5).

Tabel 5. Hasil pengujian sitotoksik larutan control dan sampel uji terhadap sel kanker payudara T47D dan sel VERO serta indeks selektivitas

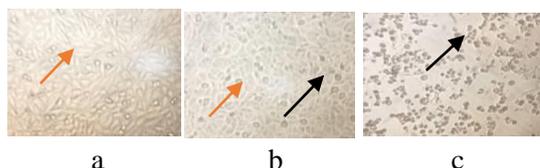
Sampel	Nilai IC ₅₀ (μ g/ml)		SI	Hasil
	Sel Kanker T47D	Sel VERO		
Ekstrak	500,167	377,631	0,75	Kurang selektif
n-Heksan	353,131	426,940	1,20	Kurang selektif
Etil Asetat	109,975	208,057	1,89	Kurang selektif
Air	303,990	542,847	1,78	Kurang selektif
Doxorubi cin	16,612	23,330	1,40	Kurang selektif

Data pada tabel 5 menunjukkan bahwa sampel uji yang digunakan kurang selektif dengan nilai selktivitas index kurang dari 3.

Menurut USA National Cancer Institut mengatakan bahwa rentan nilai IC₅₀ \leq 20 μ g/ml sangat toksik, 21-200 μ g/ml moderat/cukup aktif, 201-500 μ g/ml lemah/ sedang, dan \geq 500 μ g/ml tidak toksik (Hameed-Abdel *et al.*, 2012) Berdasarkan kriteria tersebut kelompok pengujian sitotoksik terhadap sel kanker T47D menunjukkan bahwa perlakuan ekstrak termasuk dalam kategori tidak toksik, fraksi *n*-heksan dan fraksi air termasuk dalam kategori lemah/ sedang, fraksi etil asetat termasuk dalam kategori moderat/cukup aktif, dan pembandingan doxorubicin sangat toksik.

Perlakuan uji sitotoksik terhadap sel Vero menunjukkan bahwa fraksi air termasuk dalam kategori tidak toksik, sedangkan ekstrak, fraksi n-heksan, dan fraksi etil asetat tergolong memiliki aktivitas sitotoksik lemah dan pembanding doxorubisin termasuk dalam kategori moderat atau cukup aktif terhadap sel VERO.

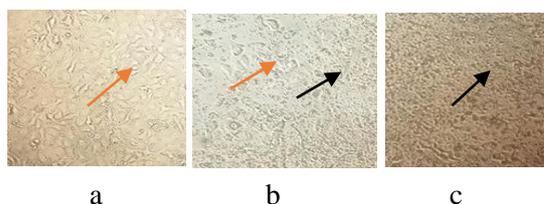
Hasil perlakuan uji sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dan sel VERO dapat dilihat pada gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Morfologi sel kanker payudara T47D (a) sebelum diberi perlakuan (b) setelah pemberian fraksi etil asetat konsentrasi 250 µg/mL, (c) setelah pemberian doxorubisin dengan pembesaran 100X. Ket : panah merah sel hidup, panah hitam sel mati

Morfologi sel kanker payudara T47D seperti yang terlihat pada gambar 1 merupakan morfologi kematian sel kanker payudara akibat pemberian larutan uji. Jelas sangat berbeda dari setiap gambar yang diperlihatkan.

Pengujian ini juga menggunakan sel normal VERO untuk mengetahui indeks selektivitas senyawa uji. Kultur sel merupakan salah satu teknik untuk mengembangkan sel diluar tubuh (*in vitro*). Penggunaan kultur sel mempunyai keuntungan yaitu lingkungan tempat hidup sel dapat dikontrol dan diatur sehingga kondisi fisiologis dari kultur relatif konstan. Perubahan morfologi sel VERO sebelum dan setelah pemberian larutan uji dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Morfologi VERO (a) sebelum diberi perlakuan (b) setelah pemberian fraksi etil asetat konsentrasi 250 µg/mL, (c) setelah pemberian doxorubisin dengan pembesaran 100X. Ket : panah merah sel hidup, panah hitam sel mati.

Gambar 2 menunjukkan adanya kematian sel VERO setelah pemberian larutan uji. Pada pengujian kanker, sebenarnya yang diharapkan adalah kematian pada sel kanker

karena jika Sel VERO jug ikut mati artinya bahwa sampel atau larutan uji yang digunakan tidak selektif membunuh sel kanker namun jugamembunuh sel normal. Hal ini akan mempengaruhi nilai akhir Selektivita Indeks.

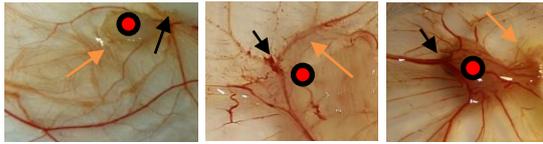
Senyawa kimia pada tanaman terdapat dalam metabolit primer dan metabolit sekunder. Sebagian besar produk metabolit sekunder berfungsi sebagai agen pelindung terhadap berbagai pathogen atau molekul pengatur pertumbuhan (misalnya zat yang merangsang hormon atau menghambat pembelahan sel dan morfogenesis). Potensi obat antikanker memiliki fungsi-fungsi fisiologis, metabolit sekunder yang bekerja secara langsung pada sel kanker dengan memodulasi sehingga akan menghambat pertumbuhan sel kanker. Beberapa komponen metabolit pada tanaman yang memiliki khasiat antikanker (antitumor): aldehid, alkaloid, *annonaceous acetogenins*, flavonoid, glikosida, lignin, lipid, lipid (*unsaponified*), asam nukleat, fenol dan turunannya, polisakarida, protein, terpenoid, serta beberapa senyawa yang tidak teridentifikasi (Kintzios dan Barberaki, 2003).

Uji Aktivitas Antiangiogenesis

Uji anti angiogenesis ini dilakukan menggunakan metode yang telah dimodifikasi yaitu tidak menggunakan *gelatin sponges* sebagai pembawa sediaan uji tetapi menggunakan *paper disc* steril. Penggunaan *paper disc* memiliki kelemahan terutama berkaitan dengan kemampuan daya serapnya. Selain itu pengamatan terhadap pembuluh darah baru dapat terganggu oleh adanya pembuluh darah asal dimana *paper disc* diimplankan dan adanya reaksi inflamasi non-spesifik, sehingga menyulitkan ketika dilakukan kuantifikasi respon angiogenesis. Namun modifikasi ini kemudian dikontrol dengan menambah satu variabel pada percobaan yaitu kelompok kontrol *paper disc* untuk meminimalisir kelemahan tersebut (Salamah *et al.*,2010).

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan beberapa kontrol pada variabel percobaan meliputi kontrol *paper disc*, kontrol pelarut, kontrol bFGF. Konsentrasi yang digunakan untuk kontrol bFGF dan kontrol pelarut yaitu tiap *paper disc* mengandung 10 µg/mL pelarut dan bFG.

Hasil respon angiogenesis pada kelompok kontrol dapat dilihat pada gambar 3.

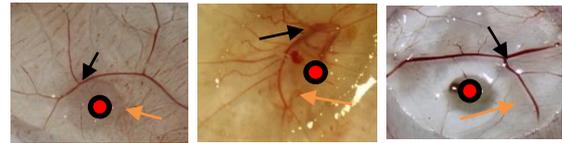


Gambar 3. Perbandingan respon angiogenesis kelompok kontrol. (A). *paper disc*, (B). *paper disc* + Pelarut DMSO 0,8%, (C). *Paper disc* + bFGF. Ket : bulatan merah *paper disc*, panah hitam pembuluh darah utama, panah kuning pembuluh darah baru.

Pengamatan secara makroskopik terhadap CAM kelompok kontrol *paper disc*, menunjukkan bahwa angiogenesis di dalam *paper disc*, maupun pada daerah di sekitar *paper disc* memperlihatkan gambaran angiogenesis yang sangat berbeda, dimana pada gambar A atau kontrol *paper disc* dan kontrol B atau kontrol pelarut hanya terbentuk sedikit angiogenesis di sekitar *paper disc* atau di luar *paper disc* yaitu dengan jumlah rata-rata 13 pembuluh darah untuk *paper disc* dan 10,66 pembuluh darah baru untuk kontrol pelarut DMSO 0,8%. Sedangkan pada gambar C atau kontrol bFGF sangat jelas terlihat bahwa terdapat banyak pembentukan pembuluh darah baru di sekitar dan bahkan di dalam *paper disc* tersebut yaitu dengan jumlah pembuluh darah baru sebanyak 24,66 (Gambar 3).

Hal ini menunjukkan bahwa protein bFGF yang terdapat pada sel kanker dapat memicu pertumbuhan pembuluh darah baru ke daerah di sekitar sel kanker tersebut sehingga suplai oksigen dan nutrisi untuk sel kanker dapat terpenuhi akibatnya sel kanker akan semakin banyak berkembang. Pemberian kontrol *paper disc* dan induktor bFGF digunakan untuk mengetahui potensi induktor tersebut terhadap munculnya pembuluh darah baru pada *paper disc* maupun di sekitar *paper disc*. Pada pembuatan seri kadar senyawa uji digunakan pelarut DMSO 0,8 %. Pelarut DMSO 0,8 % secara statistik tidak menyebabkan pertumbuhan pembuluh darah baru. Kemudian dilakukan perhitungan pertumbuhan pembuluh darah baru pada replikasi tiap-tiap kontrol untuk mengetahui jumlah rata-rata pertumbuhan pembuluh darah serta dilakukan perhitungan standar deviasi.

Hasil respon angiogenesis pada kelompok kontrol dapat dilihat pada gambar 4.

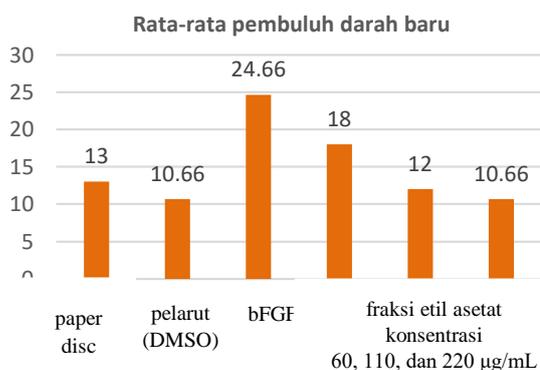


Gambar 4. Perbandingan respon angiogenesis kelompok kontrol. (A). *paper disc*, (B). *paper disc* + Pelarut DMSO 0,8%, (C). *Paper disc* + bFGF. Ket : bulatan merah *paper disc*, panah hitam pembuluh darah utama, panah kuning pembuluh darah baru.

Kelompok kontrol perlakuan atau kontrol uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu fraksi etil asetat dengan tiga seri konsentrasi yaitu konsentrasi $\frac{1}{2} IC_{50} = 59,987 \mu\text{g/mL}$, $1 IC_{50} = 109,975 \mu\text{g/mL}$ dan $2 IC_{50} = 219,95 \mu\text{g/mL}$, yang kemudian dilakukan pengenceran.

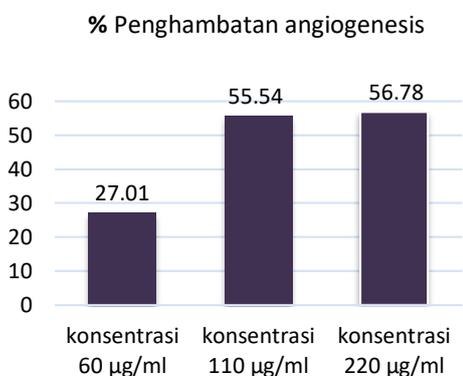
Persentase pertumbuhan pembuluh darah baru pada masing-masing kelompok perlakuan fraksi etil asetat umbi mentimun papasan dibandingkan dengan kontrol bFGF. Urutan pertumbuhan pembuluh darah dari terbanyak yaitu kelompok perlakuan fraksi etil asetat umbi mentimun papasan dengan konsentrasi $59,987 \mu\text{g/mL}$, $109,975 \mu\text{g/mL}$, dan $219,95 \mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi fraksi etil asetat umbi mentimun papasan yang digunakan semakin sedikit jumlah pertumbuhan pembuluh darah baru. Sedangkan persentase penghambatan konsentrasi terbesar ada pada konsentrasi $219,95 \mu\text{g/mL}$ dengan angka penghambatan sebesar 56,78 %, diikuti konsentrasi $109,975 \mu\text{g/mL}$ dengan persen penghambatan sebesar 53,34 %, serta konsentrasi $59,987 \mu\text{g/mL}$ dengan angka hambatan sebesar 27,01 %.

Hasil perhitungan persentase pertumbuhan pembuluh darah baru menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi fraksi etil asetat umbi mentimun papasan yang digunakan maka persen pertumbuhan pembuluh darah baru semakin kecil sehingga persen penghambatan pembuluh darah baru semakin besar. Semakin besar konsentrasi fraksi etil asetat umbi mentimun papasan yang digunakan, maka akan semakin besar pula persen penghambatan angiogenesisnya.



Gambar 5. Rata-rata pertumbuhan pembuluh darah baru pada tiap-tiap kelompok kontrol dan kelompok uji.

Gambar 5 menunjukkan jumlah rata-rata pembuluh darah pada tiap kelompok kontrol dan kelompok perlakuan fraksi etil asetat umbi mentimun papasan. Terlihat jelas bahwa kontrol bFGF mempunyai pengaruh yang sangat kuat dalam menginduksi pertumbuhan pembuluh darah baru dengan jumlah rata-rata terbanyak dibandingkan dengan kontrol *paper disc* dan kontrol pelarut. Rata-rata pembuluh darah terbanyak pada kelompok bFGF kemudian mengalami penurunan saat diberi perlakuan konsentrasi larutan uji fraksi etil asetat. Hal ini dapat dikatakan bahwa fraksi etil asetat dapat menghambat pertumbuhan pembuluh darah baru pada *Membrane Chorio Allantoic* (CAM) pada konsentrasi tertentu. Semakin besar konsentrasi fraksi etil asetat yang diberikan, maka semakin sedikit jumlah pembuluh darah baru yang dihasilkan.



Gambar 6. Hubungan konsentrasi fraksi etil asetat dengan persentase penghambatan pembuluh darah baru.

Peningkatan persentase penghambatan angiogenesis seperti yang tertera pada gambar 6 menunjukkan bahwa setiap konsentrasi perlakuan fraksi etil asetat memiliki aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan pembuluh darah. Seiring peningkatan konsentrasi fraksi etil asetat yang diujikan, maka semakin besar pula persentase penghambatan yang dihasilkan. Hal ini dapat dikatakan bahwa kemungkinan besar beberapa golongan senyawa aktif yang terkandung dalam fraksi etil asetat memiliki aktivitas antiangiogenesis

KESIMPULAN

Fraksi etil asetat umbi mentimun papasan (*Coccinia Grandis* (L). Voigt) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan kategori moderat/cukup. Nilai IC₅₀ fraksi etil asetat umbi mentimun papasan (*Coccinia Grandis* (L). Voigt terhadap sel kanker payudara T47D sebesar 109,975 µg/mL, dan 208,057 µg/mL terhadap sel VERO sehingga dinyatakan kurang selektif dengan nilai selektivitas indeks dibawah 3 yaitu sebesar 1,891. Fraksi etil asetat memiliki aktivitas antiangiogenesis terhadap CAM embrio ayam yang diinduksi bFGF. Konsentrasi efektif dari fraksi etil asetat terhadap CAM embrio ayam yang diinduksi bFGF yaitu sebesar 219,95 µg/mL.

DAFTAR PUSTAKA

Adelina, R., R. Febriyanti, I.S. Oktoberia & P. Reno. 2014. Ekstrak Daun *Annona muricata* Linn. sebagai Antiproliferasi terhadap Sel Hepar Tikus Terinduksi 7,12 Dimetilbenz [a] antracene (DMBA). *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, **4(1)**: 1-12.

Bhattacharya, B., Pinaki Pal, Asif Lalee, Dipak Kumar Mal & Amalesh Samanta. 2011. *In Vivo* and *In Vitro* anticancer activity of *Coccinia grandis* (L.) Voigt (Family: Curcubitaceae) on Swiss albino mice. *Journal of Pharmacy Research*, **4(3)**: 567-569.

- Churiyah & S. Harran. 2010. The Bioactive Proteins of *Coccinia grandis* (L). Voigh Plant Parts and Their Activity on Cancer Cells Lines. *Jurnal Farmasi Sains*, **1(1)**.
- DEPKES RI. (Departemen Kesehatan Republik Indonesia). 2001. Invertaris Tanaman Obat. Jilid I. Depkes RI, Jakarta.
- Hameed-Abdel, E.S.S., S.A. Bazaid, M.M. Shohayeb, M.M. El-Sayed & E.A. El-Walkil. 2012. Phytochemical Studies and Evaluation of Antioxidant, Anticancer and Antimicrobial Properties of *Conocarpus erectus* L. Growing in Taif, Saudi Arabia. *European Journal of Medicinal Plants*, **2(2)**: 93-112.
- Harbone, J.B. 1987. Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern menganalisis Tumbuhan. Penerbit ITB. Bandung.
- Kintzios, S.E & M.G. Baberaki. 2004. *Plants That Fight Cancer*. D.C.CRC Press, Washington, p:296.
- Munasinghe, K.A.A.M, C. Abeysena, I.S. Yaddehige, T. Vidanapathirana & K. P.B. Piyumal. *Blood sugar Lowering Effect of Coccinia grandis*.
- Nagare, S., G.S. Deokar & N.R. Phad. 2015. Review on *coccinia grandis* (L) Voigt (Ivy Gourd). *World Journal of Pharmaceutical Research*, **4(10)**: 728-743.
- Salamah, N., Sugiyanto, Mae Sri Hartati & Farida Hayati. 2010. Efek antiangiogenik ekstrak metanol akar pasak bumi (*eurycoma longifolia*, jack) pada membran korio alantoisi (cam) embrio ayam yang terinduksi bFGF. *Majalah Obat Tradisional*, **15(1)**.
- Sathees, L. Shilpa & K. Murugan. 2011. Antimicrobial activity of protease inhibitor from leaves of *Coccinia grandis* (L.) Voigt. *Indian Journal of Experimental Biology*, **49**: 366-374.
- Sun, X.T, Y.T Ding, X.G. Yan, L.Y. Wu, Q. Li, N. Ceng, Y.D. Qiu & M. Zhang. 2004. Angiogenic synergistic effect of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in an *in vitro* quantitative microcarrier-based three-dimensional fibrin angiogenesis system. *World J Gastroenterol*, **10(17)**: 2524-2528.