

## Efek Medan Listrik Frekuensi Menengah dan Intensitas Rendah terhadap Angiogenesis Tumor Payudara Tikus dan Membran Korioalantois Embrio Ayam

Endah Sri Palupi  
19/450140/SBI/00168

Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada

### INTISARI

*Electro-Capacitive Cancer Therapy* (ECCT) merupakan alat penghasil medan listrik frekuensi menengah dan intensitas rendah yang mampu menekan pertumbuhan dan perkembangan tumor payudara melalui mekanisme anti-proliferatif dan pro-apoptotik, namun belum pernah dikaji pengaruhnya terhadap angiogenesis jaringan normal dan tumor payudara. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis efek ECCT terhadap ekspresi gen *Hif1 $\alpha$* , *Sp1*, *Vegfa*, dan *Vegfr2* pada angiogenesis jaringan dan tumor payudara tikus putih yang diinduksi DMBA serta menganalisis pengaruh ECCT terhadap ekspresi protein Vegfr2 pada tumor payudara tikus putih. Lebih lanjut juga untuk menganalisis efek ECCT terhadap ekspresi gen *Vegfa* dan vaskularisasi MKA embrio ayam yang diinduksi bFGF. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan acak lengkap. Parameter yang diamati adalah ekspresi gen *Hif1 $\alpha$* , *Sp1*, *Vegfa*, dan *Vegfr2*, serta ekspresi protein Vegfr2 pada tumor payudara tikus putih, serta ekspresi gen *Vegfa* dan vaskularisasi pada angiogenesis MKA embrio ayam. Sampel penelitian meliputi jaringan dan tumor payudara tikus putih serta MKA embrio ayam yang sudah diberikan perlakuan sesuai kelompok perlakuan. Paparan ECCT dengan spesifikasi medan listrik AC frekuensi 150 kHz, tegangan 18 Vpp, dan intensitas rendah. Induksi tumor payudara tikus putih galur SD menggunakan DMBA sedangkan induksi angiogenesis pada MKA menggunakan bFGF. Kelompok perlakuan tikus putih dan MKA terdiri dari Non Induksi Non Terapi (NINT), Non Induksi Terapi (NIT), Induksi Non Terapi (INT), dan Induksi Terapi (IT). Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 6 ulangan biologis. Prosedur kerja molekuler meliputi isolasi RNA, sintesis cDNA, dan qPCR untuk mengukur tingkat ekspresi gen target, sedangkan IHC untuk menentukan ekspresi protein Vegfr2. Perlakuan angiogenesis MKA dilakukan dengan metode *ex ovo* pada embrio ayam umur inkubasi 72 jam. Setelah perlakuan, dilanjutkan kuantifikasi vaskularisasi MKA, kemudian analisis ekspresi gen. Semua data ekspresi gen dan kuantifikasi vaskuler dianalisis dengan ANOVA *one way*, sedangkan hasil IHC dianalisis menggunakan uji-t. Data persentase dianalisis menggunakan uji Kruskal-Wallis. Semua analisis menggunakan selang kepercayaan dengan  $\alpha=0,05$ . Hasil penelitian menunjukkan bahwa berdasarkan ekspresi gen angiogenik, paparan ECCT tidak berdampak terhadap angiogenesis jaringan payudara normal dan angiogenesis normal pada MKA embrio ayam (kelompok NIT). Namun demikian, pada tikus bertumor payudara kemungkinan memicu angiogenesis melalui peningkatan ekspresi Vegfr2

meskipun *Vegfa* mengalami penurunan ekspresi secara signifikan (kelompok IT), sehingga dapat dinyatakan bahwa angiogenesis pada tumor payudara tikus kemungkinan diregulasi *Vegfr2-dependent angiogenesis*. Paparan ECCT pada MKA embrio ayam yang diinduksi bFGF (kelompok IT) meningkatkan jumlah pembuluh darah baru (vaskularisasi) MKA secara signifikan, namun tidak pada ekspresi gen *Vegfa*-nya. Hasil penelitian dari kedua hewan model menunjukkan keselarasan yaitu terjadi angiogenesis pada kelompok IT, namun keduanya berbeda dalam tingkat taksonnya, yaitu Mammalia dan Aves. Oleh karena itu, dapat dinyatakan juga bahwa paparan ECCT kemungkinan menginduksi angiogenesis hanya pada jaringan dengan *growth factor* berlebihan.

Kata kunci: angiogenesis, ECCT, *growth factor*, MKA, tikus SD, tumor payudara

**The effect of intermediate-frequency and low intensity of electric field  
on angiogenesis of rat breast tumor and  
chorioallantoic membrane of chick embryo**

Endah Sri Palupi  
19/450140/SBI/00168

Faculty of Biology, Universitas Gadjah Mada

**ABSTRACT**

*Electro Capacitive Cancer Therapy* (ECCT) is an anti-tumor device resulting intermediate-frequency and low-intensity which has the capability to inhibit breast tumor growth due to anti-proliferative and pro-apoptotic capacities. However, its effect on tumor angiogenesis is unclear. The objectives of this research were to analyze the ECCT effect on the gene expression of *Hif1 $\alpha$* , *Sp1*, *Vegfa*, and *Vegfr2* of normal breast and DMBA-induced rat breast tumors and to analyze the ECCT effect on the *Vegfr2* protein expression of rat breast tumor. Moreover, to investigate the ECCT effect on the vascularization and *Vegfa* gene expression on chorioallantoic membrane (CAM) of the chick embryo. This study was experimental research with a completely randomized design using *in vivo* and *ex ovo* methods, SD rat and CAM of the chick embryo, respectively. Twenty-four animal models were divided into four groups, namely Non-Induced and Non-Therapied (NINT), Non-Induced and Therapied (NIT), Induced and Non-Therapied (INT), and Induced and Therapied (IT) groups. The parameters include gene expression of *Hif1 $\alpha$* , *Sp1*, *Vegfa* and *Vegfr2*, and *Vegfr2* protein expression, obtained from rat samples. Whereas, *Vegfa* gene expression and vascular quantification were from CAM samples. The specification of ECCT was an AC electric field with a frequency of 150 kHz, voltage 18 Vpp, and low intensity. DMBA and bFGF induced rat breast tumor and CAM angiogenesis, respectively. The procedures were molecular steps, including RNA extraction, cDNA synthesis, and qPCR analysis, while IHC was to analyze *Vegfr2* protein expression. The *ex ovo* CAM method was applied for chick embryos aged 72 hours. Vascular quantification was done after the treatment and continued with molecular steps. The relative gene expression and vascular quantification data were analyzed by one-way ANOVA, while IHC results were analyzed by an Independent t-test. The percentage of angiogenic response was analyzed by Kruskal-Wallis test. All of the statistical analysis using  $\alpha=0.05$ . The results showed that ECCT exposure does not affect normal rat breast tissue and normal angiogenesis on CAM (NIT group) based on their angiogenic gene expressions. However, ECCT exposure in rats bearing breast tumors may induce angiogenesis through *Vegfr2* upregulation since *Vegfa* gene expression was significantly downregulated, while increasing the number of blood vessels (IT group) was found in CAM. Furthermore, ECCT exposure on bFGF

induced-CAM (IT group) significantly increased the number of new blood vessels but not the *Vegfa* gene expression. In conclusion, ECCT exposure may induce angiogenesis through Vegfr2-dependent angiogenesis, besides involving excessive growth factors.

Keywords: angiogenesis, breast tumor, CAM, ECCT, growth factor, rats