

EFEK ANTIANGIOGENIK EKSTRAK METANOL AKAR PASAK BUMI (*Eurycoma longifolia*, Jack) PADA MEMBRAN KORIO ALANTOIS (CAM) EMBRIO AYAM YANG TERINDUKSI bFGF

ANTIANGIOGENIC ACTIVITY OF METHANOLIC EXTRACT FROM AKAR PASAK BUMI (*Eurycoma longifolia*, Jack) ON CHORIOALLANTOIC MEMBRANE OF CHICKEN EMBRYO INDUCED BY bFGF

Nina Salamah^{1*}, Sugiyanto², Mae Sri Hartati³ dan Farida Hayati⁴

¹. Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta

². Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³. Fakultas Kedokteran Umum Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

⁴. Prodi Farmasi Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta

ABSTRAK

*Angiogenesis merupakan peristiwa pertumbuhan pembuluh darah baru, yang memungkinkan sel kanker mendapatkan suplai nutrisi dan oksigen, sehingga dapat terus bertahan hidup. Pasak bumi (*Eurycoma longifolia*, Jack) merupakan salah satu tanaman asli Indonesia yang memiliki potensi anti kanker. Ekstrak metanol, butanol, kloroform, dan air dari akar pasak bumi terbukti memiliki efek sitotoksik terhadap beberapa sel kanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antiangiogenik ekstrak metanol akar pasak bumi pada CAM embrio ayam. Uji penghambatan angiogenesis dilakukan dengan membagi telur berembrio umur 8-9 hari dalam 8 kelompok perlakuan. Kelompok I sebagai kontrol paper disc, kelompok II sebagai kontrol bFGF, kelompok III sebagai kontrol bFGF+ pelarut DMSO 0,8%, kelompok IV, V, VI, VII dan VIII sebagai kelompok uji penghambatan angiogenesis, pada paper disc diberi bFGF 1 ng/ μ L dan ekstrak metanol akar pasak bumi berturut-turut dengan dosis 20, 40, 60, 80 dan 100 μ g/mL. Setelah diinkubasi selama 3 hari (umur embrio 12 hari), telur dibuka dan isi telur dikeluarkan, kemudian CAM yang melekat pada cangkang diamati secara makroskopik dan mikroskopik. Ekstrak metanol akar pasak bumi memberikan aktivitas antiangiogenik mulai kadar 40 μ g/mL. Peningkatan konsentrasi ekstrak metanol akar pasak bumi meningkatkan aktivitas penghambatan angiogenesis.*

*Kata kunci : angiogenesis, *Eurycoma longifolia*, pasak bumi, CAM, bFGF*

ABSTRACT

Angiogenesis is a neovascularization process which its function is to supply nutrient and oxygen for cell survival. Pasak bumi is one of the Indonesian original plants having anti cancer activity. Extract of methanol, butanol, chloroform, and water akar pasak bumi was proved to have cytotoxic effect on cancer cell culture. This research aim to know activity of antiangiogenic extract of metanol akar pasak bumi at chorioallantoic membrane of chicken embryo. Antiangiogenic activity test conducted by divide 8-9 days old egg embryo into 8 groups. Group I as paper disc control, group II as bFGF control, group III as bFGF control + DMSO 0.8% solvent, group IV, V, VI, VII, and VIII as groups of treatment. Each groups of treatment were gave by bFGF 1ng/ μ L extract of metanol akar pasak bumi respectively with concentration 20, 40, 60, 80 and 100 μ g/mL concentration. After 3 days incubation, then the chorioallantoic membrane macroscopic and microscopically analyzed. The antiangiogenic activity extract of metanol akar pasak bumi at chorioallantoic membrane bFGF induce at used concentration, that is start from 40 μ g/mL concentration. The increases of the concentration also increase the prohibition activity to angiogenesis.

*Key words : angiogenesis, *Eurycoma longifolia*, pasak bumi, CAM, bFGF*

PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit seluler yang kompleks dan melibatkan proses mikroevolusioner sehingga usaha penyembuhannya sangat sulit. Angiogenesis diketahui merupakan kunci bagi perkembangan kanker (Giavazzi *et al.*, 2000). Angiogenesis merupakan peristiwa pertumbuhan pembuluh darah baru (neovaskularisasi), memungkinkan sel mendapatkan suplai nutrisi dan oksigen, sehingga dapat terus bertahan hidup (Hanahan & Weinberg, 2000; Folkman, 1996). Diduga bahwa apabila ada agen kimia yang mempunyai kemampuan menghambat neovaskularisasi, maka agen kimia tersebut berpotensi besar dalam terapi pengobatan berbagai penyakit, termasuk kanker (Ribbati *et al.*, 2002). Oleh karena itu identifikasi dan karakterisasi terhadap faktor-faktor proangiogenik maupun inhibitor angiogenesis merupakan hal yang sangat penting dalam usaha pengobatan kanker.

Pemanfaatan obat alam sebagai salah satu alternatif obat kanker telah banyak dieksplorasi. Pasak bumi (*Eurycoma longifolia*, Jack) merupakan salah satu tanaman asli Indonesia yang memiliki potensi anti kanker (Sengupta *et al.*, 2004). Ekstrak metanol, butanol, kloroform, dan air dari akar pasak bumi terbukti memiliki efek sitotoksik terhadap sel KB, DU-145, RD, MCF-7, CaOV-3, dan MDBK (Nurhanan *et al.*, 2005). Penelitian lain menunjukkan bahwa ekstrak metanol akar pasak bumi sitotoksik terhadap kultur sel HeLa dengan nilai IC_{50} = 46,9 - 58,6 μ g/mL (Mustofa dan Qamariah, 2004). Beberapa penelitian terhadap komponen hasil isolasi akar pasak bumi, telah dilakukan secara *in vitro*. Perlu dilakukan penelitian *in vivo* untuk menggambarkan pengaruh berbagai proses farmakokinetik dan farmakodinamik serta faal di dalam tubuh, salah satunya uji anti angiogenesis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antiangiogenik ekstrak metanol akar pasak bumi pada CAM embrio ayam yang terinduksi bFGF.

METODOLOGI

Bahan

Akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) diambil dari Hutan Taman Pendidikan Fakultas

Induktor angiogenesis yang digunakan adalah *recombinant human* bFGF 1ng/ μ l dibeli dari Sigma dengan nomor produksi F 0291. Membran korio alantois (CAM) embrio ayam berasal dari telur ayam spesifik patogen free (SPF) berumur 8 hari, dibeli di Pusat Veterinaria Farma Surabaya. Bahan kimia yang lain adalah DMSO 0,8 %, larutan buffer Tris-HCL 10 mM pH 7,5, etanol 70 %, formalin 10 %, NaCl 0,9 %, aquadest steril dan hemaktosilin-eosin (HE).

Jalannya Penelitian

Identifikasi dan ekstraksi serbuk akar pasak bumi

Identifikasi serbuk akar pasak bumi dilakukan di Bagian Biologi Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, berdasarkan gambaran mikroskopik ciri-ciri serbuk akar pasak bumi yang tertulis dalam Materia Medika V (Anonim, 1989). Identifikasi ini untuk memastikan bahwa yang diteliti benar akar dari tanaman pasak bumi.

Ekstraksi menggunakan metode maserasi serbuk akar pasak bumi 200 gram dengan 500 ml pelarut metanol selama 24 jam disaring dengan corong Buchner. Maserasi diulang sebanyak 5 kali, sari metanol dievaporasi hingga diperoleh ekstrak kental. Dari 200 gram serbuk akar, diperoleh ekstrak kental sebanyak 27,21 gram (13,6 %).

Uji Anti Angiogenesis

Semua peralatan yang akan digunakan untuk uji anti angiogenesis disterilasi dengan autoclav, suhu 121°C selama 15-30 menit.

Preparasi *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) yang digunakan sebanyak 25 μ g, dibuat stok kadar 50 ng/ μ L menggunakan larutan Tris-HCL 10 mM pH 7,5 kemudian diencerkan sehingga didapat kadar 1 ng/ μ L. Preparasi bFGF ini dilakukan secara aseptis di dalam *laminar air flow*. Dosis bFGF yang diberikan untuk setiap telur perlakuan terinduksi adalah 10 ng (Sun *et al.*, 2004)

Ekstrak metanol akar pasak bumi (*E. longifolia*) dilarutkan dengan DMSO-aquadest 0,8% steril untuk kemudian dibuat seri kadar. Selanjutnya disterilkan menggunakan mikrofilter. Preparasi dilakukan secara aseptis dalam *laminar air flow*.

Telur ayam SPF umur 8 hari (inkubasi) segera diinkubasi lagi dalam inkubator laboratorium pada suhu 39 °C. Tahap awal yaitu dengan memberi tanda pada kerabang telur yang meliputi batas ruang udara, lokasi embrio dan daerah yang akan dibuat segi empat (jendela) berukuran 1x1 cm di atas embrio. Lokasi embrio diketahui melalui *candling* pada telur. Kerabang telur pada bagian kutub yang mengandung ruang

*) Korespondensi : Nina Salamah

Alamat: Fakultas Farmasi UAD, Yogyakarta

Email: syifaniputri@yahoo.com

Kehutanan Universitas Lambung Mangkurat, Banjar baru, Kalimantan Selatan. Ekstraksi dilakukan dengan pelarut metanol.

udara dan kerabang di atas embrio disucihamakan dengan alkohol. Selanjutnya pada kedua daerah tersebut dibuat lubang kecil menggunakan sebuah *mini drill*.

Udara dari ruang udara diaspirasi dengan bola karet sampai berpindah dari kutub ke kerabang bagian atas telur. Perlakuan ini dilakukan dengan posisi telur horisontal, di ruang gelap, dan melalui *candling*, sehingga ruang udara buatan yang terbentuk di atas embrio dapat terlihat. Kerabang telur di atas embrio dipotong dengan gergaji (*mini drill*) untuk membuat lubang segi empat dengan luas 1 cm². Melalui lubang ini bFGF dan larutan uji diimplantasi ke dalam membran korio alantois yang telah terbentuk, setelah sebelumnya telur disucihamakan lagi dan dimasukkan dalam *laminar air flow* dengan posisi horisontal dengan ruang udara buatan terletak di bagian atas. Subyek uji berupa telur dibagi dalam 8 kelompok (masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari 5 telur), sebagai berikut:

- kelompok I adalah telur dengan implantasi *paper disc*.
- kelompok II kelompok telur terinduksi adalah telur dengan implantasi *paper disc* termuati bFGF 10 ng.
- kelompok III kelompok kontrol bFGF + pelarut adalah kelompok telur dengan implantasi *paper disc* termuati bFGF 10 ng + pelarut (DMSO 0,8 %) sebanyak 10 µL.
- kelompok IV, V, VI, VII dan VIII merupakan telur yang digunakan untuk melihat efek penghambatan ekstrak metanol akar pasak bumi (*E. longifolia*) berturut-turut dengan dosis 20, 40, 60, 80 dan 100 µg/mL.

Telur pada kelompok perlakuan ini diberi implantasi *paper disc* ditambah bFGF 10 ng dan ekstrak metanol akar pasak bumi (*E. longifolia*), dengan variasi konsentrasi. Setelah diberi perlakuan, telur diinkubasi pada suhu 39 °C dengan kelembaban relatif 60 % selama 3 hari atau 72 jam (Ribbati *et al.*, 1997), kemudian telur dibuka (umur 12 hari) dan isi telur dikeluarkan. Telur dibuka dengan cara menggunting cangkang

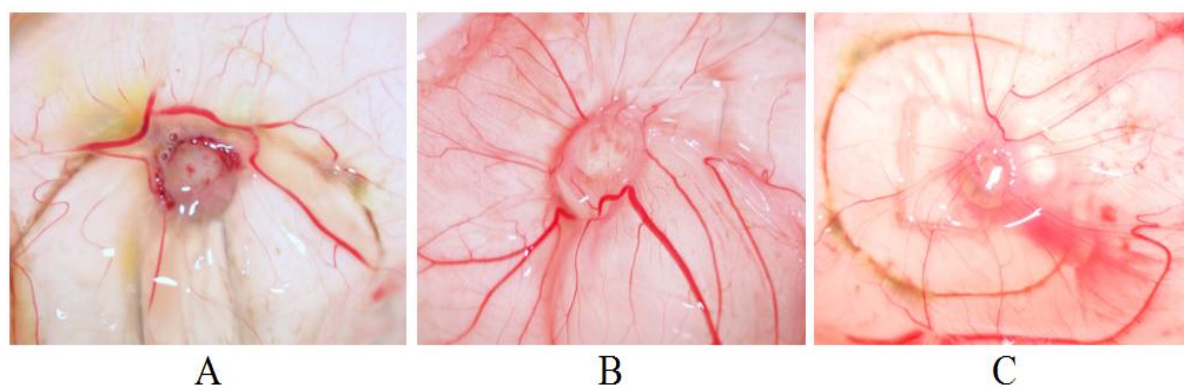
telur menjadi 2 bagian dimulai dari cangkang yang dekat dengan rongga udara, setelah itu membran korio alantois yang melekat pada cangkang diamati secara makroskopik dan mikroskopik.

Pengamatan secara makroskopik dilakukan dengan bantuan kaca pembesar, sedangkan pengamatan secara mikroskopik dilakukan terhadap preparat histologi dari CAM telur tersebut (Jenie *et al.*, 2006)

Parameter yang diamati dalam penelitian adalah banyaknya pembuluh darah baru atau respon angiogenesis pada CAM setelah pemberian ekstrak metanol akar pasak bumi (*E. longifolia*). Evaluasi efek anti angiogenesis secara makroskopik dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode Knighton *et al.* (1977). Modifikasi yang dilakukan dengan menghitung jumlah pembuluh darah baru pada atau di sekitar *paper disc*, kemudian diubah dalam skor. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan uji Kruskal Wallis dan Mann Whitney. Pengamatan secara mikroskopik dilakukan dengan mengamati preparat histologi CAM.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji anti angiogenesis ini dilakukan menggunakan metode yang dikemukakan oleh Ribbati *et al.* (1997) yang telah dimodifikasi oleh Jenie *et al.* (2006) 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 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.



Gambar 1. Perbandingan respon angiogenesis kelompok kontrol.
A. *paper disc*, B. *paper disc*+ bFGF, C. *paper disc*+ bFGF + DMSO 0,8%.

Tabel I. Hasil pengamatan angiogenesis pada kelompok kontrol.

Kelompok kontrol	N sampel	Skor
Kontrol <i>paper disc</i>	4	+1
Kontrol <i>paper disc</i> + bFGF	4	+3
Kontrol <i>paper disc</i> + bFGF + DMSO 0,8 %	4	+3

Tabel II. Hasil pengamatan angiogenesis kelompok kontrol bFGF + pelarut dan kelompok perlakuan ekstrak metanol akar pasak bumi

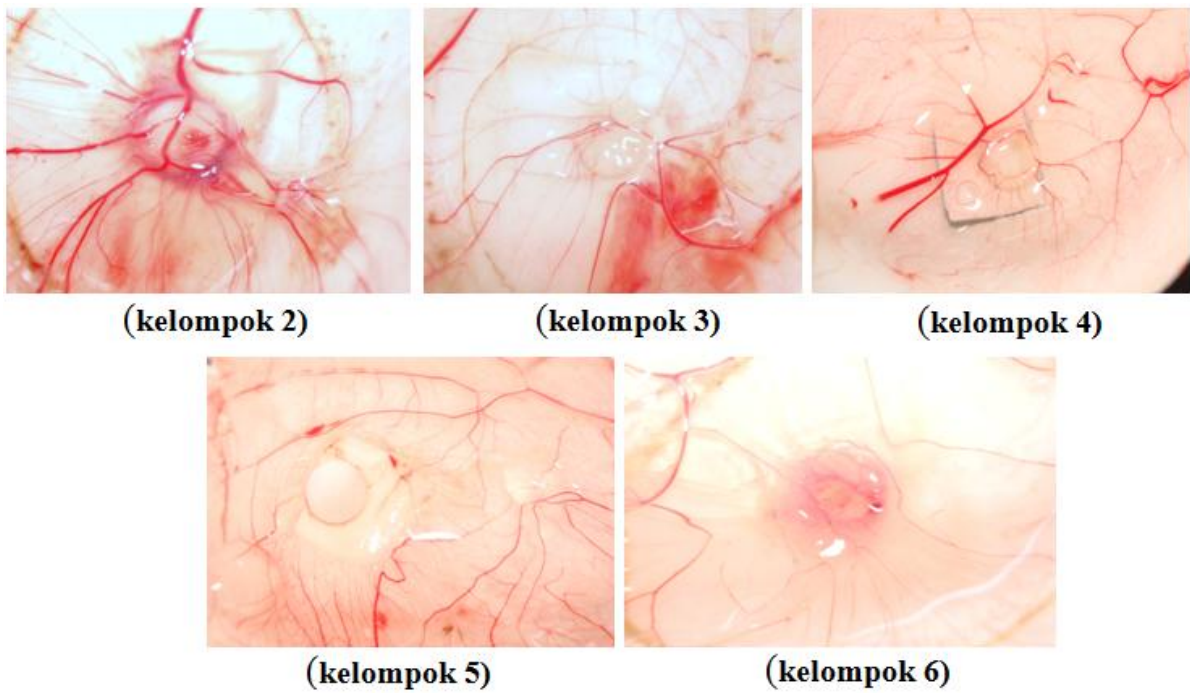
Kelompok	Perlakuan	N	Skor
1	Kontrol bFGF + pelarut	4	+3
2	bFGF + ekstrak metanol kadar 20 µg/ mL	4	+3
3	bFGF + ekstrak metanol kadar 40 µg/ mL	4	+2
4	bFGF + ekstrak metanol kadar 60 µg/ mL	4	+2
5	bFGF + ekstrak metanol kadar 80 µg/ mL	4	+2
6	bFGF + ekstrak metanol kadar 100 µg/ mL	4	+1

Kelompok kontrol berikutnya adalah kelompok kontrol *paper disc* dan pemberian induktor bFGF untuk mengetahui potensi induktor tersebut terhadap munculnya pembuluh darah baru pada *paper disc* maupun disekitar *paper disc*. Pada pembuatan seri kadar senyawa uji digunakan pelarut DMSO 0,8 % sehingga perlu diketahui apakah pelarut berpengaruh terhadap pengamatan pada CAM atau tidak. Maka dilakukan kontrol pula terhadap *paper disc* yang diberikan induktor bFGF dan ditambahkan pelarut. Hasil pengamatan makroskopik terhadap ketiga kontrol tersebut tersaji pada tabel I dan gambar 1. 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 yang sama dengan angiogenesis yang

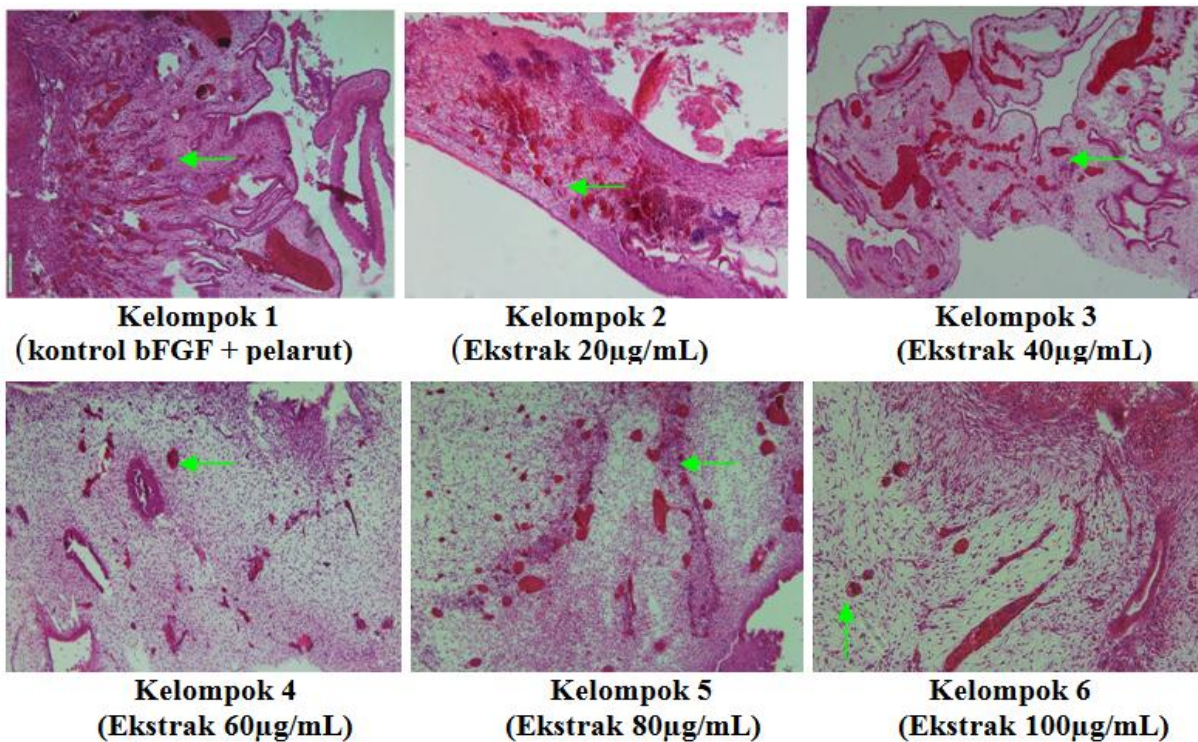
terbentuk pada keseluruhan CAM, sehingga *paper disc* bisa digunakan sebagai media pembawa dalam metode ini. Pada kelompok kontrol bFGF terlihat banyak sekali percabangan pembuluh darah baru dari pembuluh darah CAM yang terbentuk sebelumnya dan terlihat di dalam *paper disc* maupun pada daerah di sekeliling *paper disc*. Berdasarkan hal ini berarti pemberian bFGF memang benar bisa menginduksi terjadinya angiogenesis. Pengamatan kelompok kontrol bFGF + pelarut DMSO menunjukkan hasil yang tidak jauh berbeda dengan penampakan CAM kelompok kontrol bFGF. Terdapat banyak sekali pembuluh darah baru terbentuk di dalam *paper disc* maupun pada daerah di sekeliling *paper disc* dengan pola radial. Berdasarkan pengamatan ini, tampak bahwa pelarut yang digunakan tidak mempengaruhi keadaan CAM, sehingga dapat

terus digunakan. Hasil di atas juga di dukung oleh data hasil uji pada tabel I.

Analisis statistika dalam penelitian ini digunakan uji non parametrik menggunakan Kruskal Wallis dilanjutkan dengan uji Mann Whithney dengan taraf kepercayaan 95 %. Berdasarkan hasil analisis statistika kelompok kontrol ini menunjukkan bahwa antara kontrol *paper disc* dan kontrol bFGF terdapat perbedaan yang signifikan sedang antara kelompok kontrol bFGF dan kelompok kontrol pelarut tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Data ini mendukung hasil pengamatan makroskopik di atas yang menunjukkan bahwa bFGF memang induktor angiogenesis yang tepat pada metode CAM ini dan pelarut DMSO tidak berpengaruh pengamatan angiogenesis sehingga tetap bisa digunakan.



Gambar 2. Pengamatan makroskopik pembentukan pembuluh darah pada kelompok perlakuan ekstrak. Semakin tinggi kadar, kerapatan pembuluh darah di sekitar *paper disc* semakin berkurang.



Gambar 3. Gambaran mikroskopis respon angiogenesis CAM pada perbesaran 10 x 10 → menunjukkan pembuluh darah baru yang terbentuk di sekeliling *paper disc*

Seri kadar ekstrak pada uji antiangiogenik ekstrak metanol akar pasak bumi didasarkan pada uji sitotoksitas yang dilakukan oleh Mustofa dan Qomariah. (2004), menunjukkan efek sitotoksik dari ekstrak metanol pada sel HeLa dengan $IC_{50} = 46,9 - 58,6 \mu\text{g/mL}$. Mengacu pada nilai IC_{50} tersebut maka dibuatlah 5 seri kadar dari ekstrak metanol yaitu 20, 40, 60, 80 dan 100 $\mu\text{g/mL}$. Data uji anti angiogenesis ekstrak metanol akar pasak bumi tersaji pada tabel II dan gambar 2.

Hasil pengamatan makroskopik terlihat bahwa semakin tinggi kadar ekstrak, penghambatan terhadap angiogenesis juga semakin besar. Hal ini bisa dilihat dari kepadatan pembuluh darah yang semakin berkurang pada *paper disc* maupun disekitar *paper disc*. Pemberian ekstrak metanol kadar 20 $\mu\text{g/mL}$ belum memperlihatkan aktivitas penghambatan angiogenesisnya, baru pada kadar 40 $\mu\text{g/mL}$ mulai terlihat adanya penghambatan. Hasil uji statistika Kruskal Wallis menunjukkan bahwa antara kelompok kontrol dan kelompok uji ekstrak metanol dengan 5 seri kadar terdapat perbedaan penghambatan angiogenesis yang signifikan. Pada uji Mann Whitney antara kadar 40 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$ dan 80 $\mu\text{g/mL}$ ekstrak tidak terdapat perbedaan penghambatan angiogenesis yang signifikan dengan skor yang sama-sama +2 dan baru pada kadar 100 $\mu\text{g/mL}$ ekstrak terjadi perbedaan penghambatan yang sangat signifikan dengan skor +1. Hasil uji ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki potensi sebagai anti angiogenesis.

Pemeriksaan mikroskopik respon angiogenesis perlu dilakukan untuk mengetahui lebih jelas perubahan-perubahan yang terjadi pada pembuluh darah CAM akibat perlakuan ekstrak dan membandingkannya dengan gambaran mikroskopik kelompok kontrol yang diberi induktor kanker dan pelarut DMSO. Gambaran mikroskopik ini hanya untuk mendukung hasil dari gambaran makroskopik.

Gambaran histologi (Gambar 3) menunjukkan perubahan-perubahan yang terjadi pada pembuluh darah CAM kelompok perlakuan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada kelompok kontrol, terlihat jumlah pembuluh darah baru yang jauh lebih banyak bila dibanding pada kelompok perlakuan, sehingga bisa menggambarkan bahwa ekstrak akar pasak bumi memiliki aktifitas anti angiogenesis pada suatu kadar tertentu. Berdasarkan penelitian ini, diketahui bahwa ekstrak metanol akar pasak bumi mampu menghambat angiogenesis meski belum bisa dipastikan mengenai mekanisme aksi penghambatannya. Ada pun mekanisme yang terjadi pada pelepasan bFGF sebagai *Growth*

Factor, yaitu bFGF berinteraksi dengan sel endothelial melalui reseptor *tirosin kinase* dan reseptor *heparan sulfate proteoglycan* (HSPGs) di permukaan sel. Keseimbangan antara penyimpanan dan pelepasan bFGF di matriks ekstra selular mungkin adalah suatu pengaturan efek biologi dari faktor pertumbuhan ini di endothelium. Angiogenesis merupakan suatu proses kompleks, dimana terjadi keseimbangan antara faktor pro angiogenik dan antiangiogenik. Jadi untuk melakukan penghambatan angiogenesis, penetralan terhadap salah satu faktor pro angiogenik (bFGF) sudah cukup untuk mengganggu proses keseimbangan angiogenesis (Ribatti, 2002).

Penelitian mengenai anti angiogenesis pada ekstrak metanol akar pasak bumi belum pernah dilakukan sehingga mekanisme penghambatannya belum jelas diketahui. Penghambatan angiogenesis merupakan sebuah tawaran yang menarik untuk target terapi dengan toksisitas yang rendah. Berdasarkan pada kecepatan mutasi yang rendah pada kestabilan genetik sel endothelial, terapi antiangiogenik adalah langkah awal untuk terapi tumor spesifik (Kleinsmith *et al.*, 1999). Target terapi kanker dengan penghambatan angiogenesis langsung pada sel endothelial yaitu sel pembentuk pembuluh darah baru kemungkinan juga sangat berhubungan dengan mekanisme target terapi kanker yang lain seperti menginduksi apoptosis terhadap sel endothelial, menghambat terjadinya proliferasi sel endothelial serta menghambat terjadinya metastasis karena pembuluh darah baru yang akan digunakan untuk metastasis dari sel kanker tidak terbentuk.

Penelitian mengenai efek senyawa hasil isolasi ekstrak metanol akar pasak bumi dalam menginduksi apoptosis terhadap kultur sel HeLa dilakukan Nurkhasanah and Pihie. (2006) yang kemungkinan berhubungan dengan mekanisme penghambatan angiogenesis secara langsung pada sel endothelial yaitu menghambat terjadinya migrasi dan proliferasi sehingga pembuluh darah baru tidak terbentuk. Pada proses ini, bila ada sel endothelial yang tetap lepas bermigrasi kemungkinan bisa dihambat melalui mekanisme apoptosis sehingga sel endothelial tersebut tidak bisa berproliferasi membentuk pembuluh darah baru. Penghambatan pembentukan pembuluh darah ini kemungkinan juga sangat berperan dalam menghambat terjadinya metastasis karena pembuluh darah baru juga menjadi salah satu jalan sel kanker untuk metastasis. Ada kemungkinan metastasis sel kanker dengan cara lain yaitu melalui sistem limfatik, tapi masih perlu studi lebih lanjut, apakah ekstrak metanol akar

pasak bumi dalam studi ini mempunyai kemampuan untuk menghambat metastasis melalui pembuluh limfa.

KESIMPULAN

Ekstrak metanol akar pasak bumi mempunyai aktivitas antiangiogenik mulai kadar 40 µg/mL. Peningkatan konsentrasi ekstrak metanol akar pasak bumi meningkatkan aktivitas penghambatan angiogenesis.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1989, *Materia Medika Indonesia*, Jilid V, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal 212-215.
- Folkman, J, 1996, Fighting Cancer by Attaching its Blood Supply, *Scientific American* 19: 116-119
- Giavazzi, R., Albini, A., Bussolino, F., DeBraud, F., Presta, M., Ziche, M., Costa, A., 2000, The biological basis for antiangiogenic therapy (meeting report), *European Journal of Cancer*, 36: 1913-1918.
- Hanahan, D and Weinberg, R.A., 2000, The Hallmark of Cancer, *Cell*, 100:57-68.
- Jenie R.I., Meiyanto, E., Murwanti, R., 2006, Efek antiangiogenik ekstrak etanolik daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam, *Majalah Farmasi Indonesia*, 17(1):50-55
- Kleinsmith, L.J., Kerrigan, D, Kelly., 1999, Angiogenesis, <http://press2.nci.nih.gov/sciencebehind/angiogenesis/angio00.html>, (diakses bulan Agustus 2008).
- Knighton, D., D. Ausprunk, D.Tapper, and J. Folkman, 1977, Avascular and Vascular Phases of Tumor Growth in The Chick Embryo. *Br.J. Cancer* 35 no. 347-356.
- Mustofa dan Qomariah N., 2004, Aktivitas Antiplasmodial *in vitro* dan Sitotoksik Akar Pasak Bumi terhadap malaria di Kalimantan Selatan, *Medika*, 3, 147-152
- Nurhanan M.Y., Hawariah L.P.A, Ilham A.M., Shukri, M.A.M, 2005, Cytotoxic Effects of the Root Extracts of *Eurycoma longifolia*, *Jack, Phytother. Res.* 19:994-996
- Nurkhasanah and Pihie A.H.L., 2006, Apoptotic Cell Death Induced by Eurycomanone (*Eurycoma longifolia*, Jack) in Human Cervical Carcinoma Cells, *Proceeding of International Conference on Mathematics and Natural Sciences*
- Ribatti, D., Gulandaris, A., Bastaki, M., Vacca, A., Lurlalo, M., Roncali, L., Presta, M., 1997, New Model for Study of angiogenesis and Antiangiogenesis in The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane: The Gelatin Sponge/ Chorioallantoic Membrane Assay, *J Vasc Res*, 34: 455-463.
- Ribbati, D., Vacca, A., Presta, M., 2002, The discovery of angiogenic factors: A historical review, *General Pharmacology*, 35:227-231.
- Sengupta, S., Toh S.A., Sellers L.A., Skepper, J.N., Koolwijk, P., Leung, H.W., Yeung H.W., Wong, R.N.S., Sasisekharan R., Fan, T.P.D, 2004, Modulating Angiogenesis : The Yin and the Yang in Ginseng, *Circulation*. 110:1219-1225
- Sun, X., Ding, Y., Yan, X., Wu, L., Li, Q., Ceng, N., Qiu, Y., Zhang, M., 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* 2004; 10(17): 2524-2528