

Hambatan Ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* oleh Ekstrak Daun Sambung Nyawa pada Endotel Membran Korioalantois

(EFFECTIVITY OF SAMBUNG NYAWA LEAF EXTRACT TO INHIBIT VASCULAR
ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR EXPRESSION ON ENDOTHELIALS
OF CHORIOALLANTOIC MEMBRANE)

Iwan Sahrial Hamid¹, Dady Soegianto Nazar², Hermin Ratnani³

¹Departemen Kedokteran Dasar Veteriner, ²Departemen Produksi Ternak,

³Departemen Reproduksi Veteriner.

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Kampus C Unair

Jln. Mulyorejo Surabaya Telp. 031-5992785

Email : kelana_dawley68@yahoo.com

ABSTRAK

Angiogenesis adalah proses pembentukan pembuluh darah baru yang terjadi secara normal dan sangat penting dalam proses pertumbuhan dan perkembangan. Angiogenesis juga memberikan kontribusi pada karsinogenesis atau pertumbuhan sel kanker yang tidak terkendali dan bersifat ganas, berkembang menjadi suatu yang bersifat patologi seperti pada keadaan inflamasi dan akibat beberapa penyakit infeksi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas ekstrak daun sambung nyawa (*Gynura procumbens*) berbagai dosis dalam menghambat ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Penelitian tersebut dilakukan sebagai upaya mencegah pertumbuhan kanker. Penelitian ini menggunakan 24 butir telur ayam berembrio (TAB) yang terbagi dalam enam kelompok perlakuan, terdiri dari kelompok I: empat butir TAB merupakan kelompok kontrol negatif pelarut, kelompok II: empat butir TAB merupakan kelompok perlakuan nol diinokulasi dengan bFGF 60 ng, kelompok III-VI: terdiri empat butir TAB dalam setiap kelompok, merupakan perlakuan yang diberi ekstrak *G. procumbens* sebesar 60, 75, 90 dan 110 µg + bFGF 60 ng. Semua bahan uji diinokulasikan pada TAB melalui media *paper dish*. Telur ayam bertunas yang digunakan berumur sembilan hari dan diinkubasi selama 72 jam. Ekspresi VEGF pada pembuluh darah membran korioalantois diamati dengan metode imunohistokimia menggunakan antibodi anti-VEGF. Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) pada pemberian ekstrak *G. procumbens* terhadap ekspresi VEGF. Hasil hambatan VEGF yang nyata terdapat pada pemberian ekstrak *G. procumbens* dosis 110 µg. Simpulannya adalah bahwa ekstrak *G. procumbens* mampu menghambat ekspresi VEGF pada pembentukan pembuluh darah baru membran korioalantois TAB.

Kata-kata Kunci : *angiogenesis*, VEGF, *Gynura procumbens*, membran korioalantois

ABSTRACT

Angiogenesis is the new blood vessels formation normality and important on growth and development of individu. Angiogenesis also have contribution to carcinogenesis or uncontrolled and malignant cancer cell development, become pathologic condition like inflammatory and infection. The purpose of this research for knew the effectivities of *Gynura procumbens* extract on various dose for inhibition Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) expression. This research was done to effort cancer progress inhibition. However, angiogenesis is part of carcinogenesis causes. The Chorio Allantoic Membrane (CAM) methods was used for this aim. Eggs at the age of nine days were divided into 6 groups. Group I were negative control of vehicle, group II were zero treatment: 60 ng bFGF which applied into paper dish. The next four groups were extract of *Gynura procumbens* that divided in four dose: 60, 75, 90 and 110 µg + bFGF 60 ng which applied into paper dish. At the twelve days old, VEGF expression analysis was done which immunohistochemical method with anti VEGF's antibody. The result of this research showed that there was significant different ($p < 0.05$) on give of *Gynura procumbens* extract to VEGF expression. The most significant VEGF inhibition by *Gynura procumbens* extract with dose 110 µg. The conclusion on this study was *Gynura procumbens* extract effective to inhibit the VEGF expression on CAM embrio chick.

Key words: *Angiogenesis*, VEGF, *Gynura procumbens*, CAM

PENDAHULUAN

Beberapa upaya untuk mengatasi semakin meningkatnya kejadian kanker masih banyak menemui kendala, baik dalam upaya pencegahan maupun pengobatan kanker. Pengobatan yang selama ini dilakukan meliputi penyinaran, radioterapi, pembedahan, dan kemoterapi menggunakan obat (Novalina, 2003). Pengobatan kanker dengan cara membunuh selnya dianggap masih kurang efektif karena karsinogen yang terdapat dalam sel kanker masih dapat menyebar ke jaringan lain bersama aliran darah. Oleh karena itu, pengobatan kanker melalui penghambatan angiogenesis lebih efektif dalam mengobati kanker dari pada membunuh sel kanker secara langsung. Selain itu penghambatan angiogenesis mengakibatkan hambatan pada distribusi nutrisi dan oksigen ke sel kanker juga akan terhambat (Raffi, 2002).

Proses angiogenesis sebagai indikator adanya perubahan status sel kanker dari jinak menjadi ganas. Sel kanker diketahui bersifat maligna apabila sudah berukuran lebih dari 2 mm³ (Bergers dan Hanahan, 2002). Perkembangan sel kanker terutama yang bersifat maligna menginduksi terbentuknya angiogenesis dengan mengaktifasi beberapa faktor pertumbuhan seperti *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF), *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Epidermal Growth Factor* (EGF), dan *Tumour Necrosis Factor* (TNF α) (Papetti dan Herman, 2002).

Vascular Endothelial Growth Factor diketahui mempunyai kontribusi besar terhadap angiogenesis. Percobaan *in vitro* sel endotel kapiler menunjukkan bahwa VEGF merupakan stimulator yang potensial terhadap angiogenesis sebab keberadaannya sebagai faktor pertumbuhan mengakibatkan proliferasi dan migrasi sel endotel, bahkan pembentuk *tube formation* pada perangkaian pembuluh kapiler (Prior *et al.*, 2004). *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) memicu transformasi embrional mesoderm menjadi *hemangioblast*. Terbentuknya *hemangioblast* mengaktifasi VEGF membentuk *angioblast*, selanjutnya *angioblast* berdeferensiasi menjadi sel endotel yang bermigrasi ke arah tepi lumen pembuluh darah (Papetti dan Herman, 2002).

Penggunaan obat asal tanaman menjadi alternatif dalam upaya pencegahan kanker melalui hambatan angiogenesis. Dipilih satu tanaman obat yang digunakan dalam penelitian

ini yaitu ekstrak daun sambung nyawa (*Gynura procumbens*), berdasarkan penelitian sebelumnya telah dicoba khasiatnya baik *in vitro* maupun *in vivo* pada beberapa kejadian kanker, seperti kanker kelenjar mammae, kanker paru, kanker serviks, dan kolon (Meiyanto, *et al.*, 2007). Angiogenesis tidak terlepas dari peran besar faktor pertumbuhan, maka sebagai tujuan utama dalam penelitian ini adalah untuk mengamati ekspresi VEGF sebagai faktor pertumbuhan angiogenesis dengan metode imunohistokimia. Pengamatan dilakukan dengan pemberian ekstrak daun *G. procumbens* dalam berbagai dosis pada endotel pembuluh darah membran korioalantois telur ayam berembrio yang diinduksi dengan bFGF.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan telur ayam berembrio (TAB) *Specific Pathogen Free* (SPF) dari Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma), Surabaya berumur sembilan hari sebagai bahan untuk uji antiangiogenesis. Telur Ayam Berembrio yang dipakai berasal dari induk ayam jenis *Hubbard* (PT. Wonokoyo). Tanaman yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun sambung nyawa (*G. procumbens*) dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Surakarta. Daun dari tanaman tersebut diambil secara acak dengan kondisi yang masih segar lalu diproses hingga mendapatkan ekstrak etanolnya. Ekstrak etanol *G. procumbens* yang digunakan adalah dosis 60, 75, 90 dan 110 μ g. Induktor angiogenesis yang digunakan adalah *recombinant human* bFGF (*Nako Pure Chemical Industries Ltd. Japan*) yang dilarutkan dengan Tris-HCl pH 7,5.

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sambung Nyawa (*G. procumbens*)

Daun *G. procumbens* dicuci bersih dengan air mengalir, ditiriskan, dijemur di bawah panas matahari tidak langsung dengan ditutupi kain berwarna gelap. Setelah kering, dibuat serbuk dan diayak hingga diperoleh serbuk daun *G. procumbens*. Sebanyak 500 gram serbuk diekstrak dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 1,5 L. Pengadukan dilakukan dua kali yaitu pada pagi dan sore hari, setelah 3 x 24 jam dilakukan penyaringan. Ampas dimaserasi kembali dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1,5 L. Maserasi dilakukan tiga kali. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan

kemudian diendapkan, lalu disaring untuk selanjutnya diuapkan dengan pengurangan tekanan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental.

Ekstrak etanol *G. procumbens* ditimbang sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dalam 2% *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) dalam aquabidestilata steril sehingga diperoleh stok dengan konsentrasi 1 µg/µl. Larutan uji disaring dengan filter 0,22 µm, dimasukkan dalam flakon steril dan dibuat seri dosis. Dosis yang diinokulasikan pada chorioallantoic membrane (CAM) terdiri dari empat seri dosis yaitu 60, 75, 90, dan 110 µg per telur. Pembuatan larutan uji ini dilakukan dalam *Laminar Air Flow-hood* secara aseptis.

Perlakuan pada Telur Ayam Berembrio

Telur ayam berembrio umur sembilan hari diberi tanda pada kerabang telur yang meliputi batas ruang udara, lokasi embrio dan daerah lubang segiempat (jendela) berukuran 1 cm² di atas embrio. Senyawa bFGF dan ekstrak diimplankan melalui *paper disc*. Subjek uji yang berupa telur dibagi dalam enam kelompok dan setiap kelompok ada empat ulangan : Kelompok I, pelarut Tris-HCl dan DMSO 2%, Kelompok II, bFGF 60 ng dan pelarut Tris-HCl dan DMSO 2%, Kelompok III, IV, V dan VI ekstrak etanol *G. procumbens* sebanyak 60, 75, 90, dan 110 µg dalam DMSO 2%. Setelah diberi perlakuan, kemudian telur diinkubasi pada suhu 38° C dan kelembaban relatif 60 % selama 72 jam (Ribatti, *et al.*, 1997). Membran korioalantois yang terdapat pembuluh darah dikoleksi pada buffer formalin. Selanjutnya dilakukan pembuatan sediaan imunohistokimia.

Pembuatan Sediaan Imunohistokimia

Membran korioalantois TAB yang terdapat pembuluh darah dimasukkan dalam blok parafin dipotong setebal 3-4 µm dan diletakkan di atas *slide polylysin* kemudian diinkubasi semalam dalam inkubator pada suhu 45° C. Selanjutnya dilakukan deparafinisasi dengan *xilen* sebanyak tiga kali masing-masing selama tiga menit. Dilanjutkan pencucian dengan *phosphate buffer saline* (PBS) sebanyak tiga kali masing-masing selama lima menit. Preparat kemudian direndam dalam 3% hidrogen peroksida (H₂O₂ dalam metanol) selama 20 menit, lalu dicuci dengan akuades dilanjutkan pencucian dengan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama lima menit. Selanjutnya dilakukan *antigen retrieval* dengan melakukan perendaman preparat dalam bufer sitrat pH 6,0 di dalam

microwave. Lalu dibiarkan dingin selama 20-30 menit, dan lanjutkan dengan pencucian PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama lima menit. Penambahan 0,1% protease selama 20 menit pada 37°C, didigesti dengan 100 µg/mL proteinase K dalam buffer (0,01 mol/L trish HCl pH 7,8 0,005 mol/l EDTA dan 0,5 % SDS) selama 15 menit. Setelah itu dicuci dengan PBS selama 10 menit. Preparat diinkubasikan dalam *normal mouse serum* selama lima menit. Selanjutnya *normal mouse serum* dibersihkan (tanpa cuci), preparat ditetesi dengan antibodi primer dalam antibodi *diluent* (perbandingan 1 : 50) IgG₁ (antibodi monoklonal anti VEGF) selama 60 menit atau semalam dalam lemari es (8°C). Dicuci dalam PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama lima menit. Preparat diinkubasikan dengan antibodi sekunder *IgG human antirabbit* selama lima menit, lalu dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama lima menit. Kemudian ditetesi dengan *streptavidin-peroksidase* selama lima menit, lalu dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama lima menit. Dilanjutkan dengan inkubasi dalam *Dimetil Amino Benzene* (DAB) selama 5-15 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir selama 10-15 menit, selanjutnya dilakukan *counterstain* dengan *hematoxylin eosin* selama 3-4 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir 10-15 menit. Rehidrasi secara bertingkat dilakukan dengan etanol absolut, etanol 95%, etanol 80%, dan *xylol* sebanyak dua kali. Selanjutnya dilakukan pemberian *mounting media* (gliserol gelatin) sebelum ditutup dengan *cover glass*. Pembuatan sediaan imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Rumah Sakit dr. Sardjito Yogyakarta.

Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis ekspresi VEGF dengan Analisis Varian (Anova), uji *Fisher* (F) satu arah taraf kepercayaan 95% dan bila terjadi perbedaan signifikan dilanjutkan uji perbandingan rataan setiap kelompok perlakuan dengan uji Jarak Berganda *Duncan*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil gambar pengamatan ekspresi VEGF pada kelompok perlakuan nol tampak pada sel endotel yang tersebar pada potongan pembuluh darah baru didominasi oleh adanya warna coklat. Hal tersebut sangat kontras bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif yang hanya diberi pelarut, lebih didominasi warna biru pada sitoplasma sel endotel. Hasil

gambar ekspresi VEGF pada pemberian ekstrak *G. procumbens* semakin berkurang warna coklat pada sitoplasma seiring dengan peningkatan dosis ekstrak dari 60 µg sampai dengan 110 µg. Hasil pengamatan mikroskopis ekspresi VEGF pada setiap kelompok perlakuan disajikan pada Gambar 1.

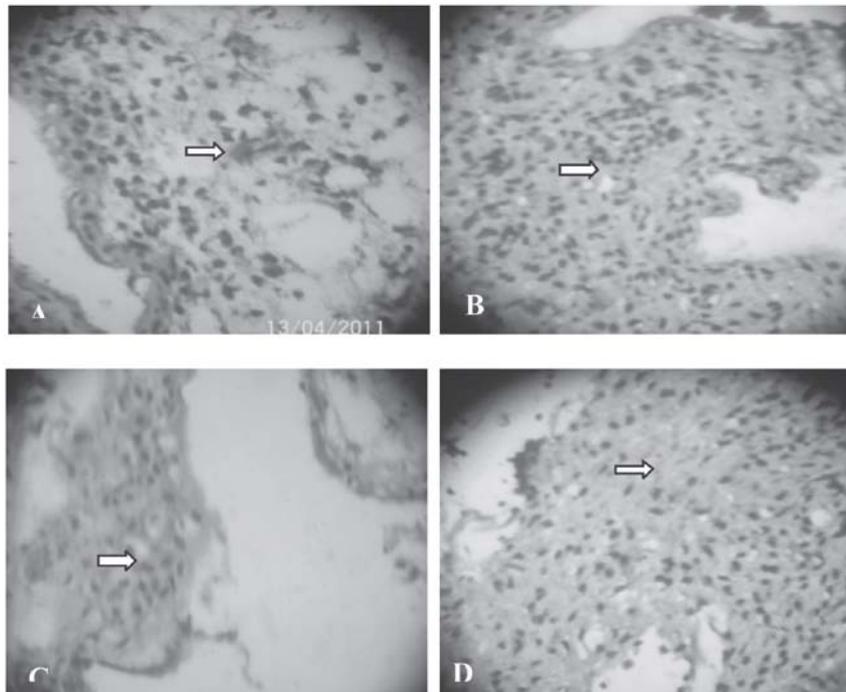
Hasil pengamatan mikroskopis ekspresi VEGF dilanjutkan dengan melakukan penghitungan terhadap sel endotel yang tampak berwarna coklat. Penghitungan dilakukan terhadap tiga lapang pandang selanjutnya dijumlahkan minimal pada 100 sel. Data penghitungan yang diperoleh dari semua kelompok perlakuan dilakukan analisis statistika dengan menggunakan bantuan perangkat lunak SPSS 13.0 *version for windows*. Analisis data diawali dengan uji normalitas *One-sample Kolmogorov-Smirnov*, setelah semua data dari setiap kelompok perlakuan dimasukkan pada program, maka didapatkan hasil probabilitas atau $p = 0,896$, ini berarti data berdistribusi normal karena lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$). Setelah didapat hasil uji normalitas data, maka selanjutnya untuk mengetahui perbedaan rata-rata jumlah ekspresi VEGF dengan pemberian ekstrak *G.*

procumbens berbagai dosis dilakukan analisis varian uji F. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nyata pada pemberian ekstrak *G. procumbens* dengan berbagai dosis terhadap jumlah VEGF yang diekspresikan pada sel endotel pembuluh darah baru korioalantois TAB.

Adanya perbedaan signifikan pada uji F, maka perlu dilakukan uji lanjutan. Perbedaan rata-rata ekspresi VEGF antar perlakuan dapat dijelaskan melalui uji lanjutan menggunakan uji jarak berganda *Duncan*. Rataan ekspresi VEGF dan persentase hambatan VEGF pada setiap kelompok perlakuan disajikan pada Tabel 1.

Hasil penghitungan rata-rata ekspresi VEGF tertinggi didapatkan pada perlakuan nol pemberian bFGF 60 ng tanpa ekstrak (II) yaitu sebesar $153,75 \pm 21,40$ dan rata-rata tersebut tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) dengan perlakuan ekstrak 60 µg (III), yaitu $135,25 \pm 20,22$.

Ekspresi VEGF yang rendah didapatkan pada kelompok kontrol pelarut (I) yaitu $48,75 \pm 7,89$ dan kelompok ekstrak 110 µg (VI) yaitu $76,25 \pm 24,78$, kedua kelompok perlakuan tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$). Kelompok perlakuan I dan



Gambar 1. Ekspresi VEGF pada sel endotel pembuluh darah membran korioalantois TAB, A) kelompok perlakuan nol bFGF 60 ng dengan pembesaran 400x, B) kelompok kontrol negatif pelarut dengan pembesaran 400x, C) kelompok perlakuan ekstrak 75 µg dengan pembesaran 400x, D) kelompok perlakuan ekstrak 110 µg dengan pembesaran 400x. Tanda panah menunjukkan ekspresi VEGF.

Tabel 1. Rataan jumlah ekspresi VEGF pada setiap kelompok perlakuan

No	Kelompok Perlakuan	Rataan
I	Kontrol negatif(Tris HCl dan DMSO)	48,75 ^c ± 7,89
II	Perlakuan Nol(bFGF 60 ng + Tris HCl dan DMSO)	153,75 ^a ± 21,40
III	Perlakuan I(Ekstrak <i>G.procumbens</i> 60 µg+ bFGF 60 ng)	135,25 ^a ± 20,22
IV	Perlakuan II(Ekstrak <i>G.procumbens</i> 75 µg+ bFGF 60 ng)	93,00 ^b ± 32,61
V	Perlakuan III(Ekstrak <i>G.procumbens</i> 90 µg+ bFGF 60 ng)	93,00 ^b ± 15,08
VI	Perlakuan IV(Ekstrak <i>G.procumbens</i> 110 µg+ bFGF 60 ng)	76,25 ^{bc} ± 24,78

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (p<0,05) VEGF = vascular endothelial growth factor; DMSO = dimethyl sulfoxide, bFGF = basic Fibroblast growth factor

VI memberikan hasil yang terbaik terhadap hambatan ekspresi VEGF, hasil tersebut berbeda nyata (p<0,05) dibandingkan dengan kelompok perlakuan II dan III. Perlakuan ekstrak 75 µg (IV) dan 90 µg (V) memberikan hasil rataaan yang relatif sama yaitu 93,00 ± 32,61 dan 93,00 ± 15,08. Kelompok perlakuan IV dan V juga memberikan hasil rataaan ekspresi VEGF yang berbeda nyata (p<0,05) dibandingkan dengan kelompok perlakuan bFGF (II) dan III.

Ekspresi VEGF ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada sitoplasma sel yang merupakan kompleks ikatan ligan VEGF dengan reseptor VEGF terdeteksi oleh antibodi anti VEGF yang terikat spesifik dengan ligan VEGF. Konsep ekspresi VEGF tersebut tampaknya sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Puspita *et al.*, (2009) bahwa terjadi ekspresi VEGF pada sitoplasma sel yang diberi induktor bFGF. Menurut Giovana *et al.*, (2009), ikatan reseptor VEGF dan ligan spesifik VEGF terjadi pada domain transmembran dan sitoplasmik, bahkan VEGF diketahui sebagai promotor angiogenesis dan merupakan regulator endogen untuk integritas endotel, beberapa senyawa anti VEGF dapat menyebabkan disfungsi endotel dan penurunan angiogenesis.

Ekstrak *G. procumbens* tampaknya berperan penting dalam hambatan angiogenesis melalui penurunan ekspresi VEGF. Kandungan flavonoid mempunyai peran dalam menghambat beberapa faktor pertumbuhan angiogenesis maupun tumor. Pernyataan tersebut sesuai dengan hasil penelitian Wen-fu *et al.*, (2002) yang melaporkan bahwa *quercetin* yang terkandung dalam *flavonoid* ekstrak daun *G. procumbens* menekan pertumbuhan tumor *in vitro* dan *in vivo* melalui hambatan aktivitas tirosin kinase, sedangkan pertumbuhan tumor

merupakan salah satu pemicu aktivitas faktor pertumbuhan angiogenesis, salah satunya VEGF, untuk memulai proses pembentukan pembuluh darah baru (Kristy dan Napoleon, 2006).

Kandungan beberapa senyawa aktif dalam ekstrak daun *G. procumbens* seperti *â sitosterol*, *4-hidroksi-4 metil-2-pentanon*, *quercetin* dan *resveratrol* diduga mempunyai aktivitas sebagai antikanker melalui beberapa kemungkinan mekanisme, yaitu sebagai penghambat proses sinyal tranduksi, memacu *cell cycle arrest*, apoptosis, dan bahkan menghambat metastasis (Sugiyanto *et al.*, 2003).

Igura *et al.*, (2001) juga melaporkan bahwa *resveratrol* dan *quercetin* pada kadar 100 µM mampu menghambat aspek-aspek angiogenesis (proliferasi, migrasi sel endothelial, dan pembentukan pipa pembuluh darah). *Silymarin*, suatu flavonoid antioksidan, sedang dikembangkan sebagai agen inhibitor terhadap enzim COX-2 (*cyclooxygenase-2*) (Tosetti *et al.*, 2002). Senyawa tersebut menurunkan jumlah *Human Vascular Endothelial Cells* (HUVEC) pada kadar 50 µg/ml.

Terdapat dugaan bahwa kandungan senyawa yang ada dalam ekstrak *G. procumbens* mungkin bertindak sebagai inhibitor aktivitas COX-2 yang dipicu oleh angiogenik bFGF. Mekanisme hambatan angiogenesis melalui hambatan ekspresi VEGF, berdasarkan beberapa penelitian yang dilakukan oleh peneliti lain dapat dijelaskan bahwa kandungan flavonoid ekstrak *G. procumbens* kemungkinan menghambat reseptor VEGF (VEGFR2) melalui hambatan aktivitas *Matrix Metallo Proteinase* (MMP), tirosin kinase, dan *Cyclooxygenase-2* (COX-2) (Masferrer dan Leahy, 2000).

SIMPULAN

Ekstrak *G. procumbens* dalam berbagai dosis dapat menghambat ekspresi VEGF pada sel endotel pembuluh darah membran korioalantois telur ayam berembrio yang diinduksi bFGF. Ekspresi VEGF terendah dan hambatan ekspresi VEGF tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak *G. procumbens* 110 µg.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengamatan terhadap beberapa variabel lain yang diduga berpengaruh terhadap mekanisme angiogenesis. Selain itu disarankan untuk menggunakan bahan tanaman lain yang berkhasiat sebagai antiangiogenesis dengan metode tentang model induksi angiogenesis menggunakan TAB.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada proyek Hibah Penelitian RKAT DIP A Fakultas Kedokteran Hewan Unair. Tahun 2011.

DAFTAR PUSTAKA

- Bergers G, Hanahan D .2008. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 8: 592–603
- Giovana S, Di Marco, Stefan R, Uta H, Susanne A, Maximilian, König, Etienne L, Hans O, Eva B, Hermann P, Marcus, B. 2009. The Soluble VEGF Receptor sFlt1 Contributes to Endothelial Dysfunction in CKD. *Journal of the American society of Nephrology* 20 (10): 2235-2245.
- Igura K, Ohta T, Kuroda Y, Kaji. K., 2001, Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro, *Cancer Lett* 171 (1): 11-6
- Kristy R, Napoleone F. 2006. Imaging tumor angiogenesis. *J Clin Invest* 116 (10): 2585–2587.
- Masferrer JL, Leahy KM. 2000, Antiangiogenic and Antitumor Activities of Cyclooxygenase-2 Inhibitors, *Cancer Res* 60: 1306-1311
- Meiyanto E, Susilowati S, Tasminatun S, Murwanti R, Sugiyanto. 2007. Efek kemopreventif ekstrak etanolik *Gynura procumbens* (Lour), Merr pada karsinogenesis kanker payudara tikus. *Majalah Farmasi Indonesia* 18(3): 154-161.
- Novalina. 2003. Penggunaan Tanaman Obat Sebagai Upaya Alternatif dalam Terapi Kanker. Pengantar ke Falsafah Sain. PPS Institut Pertanian Bogor.
- Papetti M. Herman IM. 2002. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C947-C970.
- Prior BM, Yang HT, Terjung RL. 2004. What makes vessels grow with exercise training. *J App Physiol* 97: 1119-28.
- Puspita N, Ardiani M, Fina AG, Septisetyani EP, Meiyanto E. 2002. Ekstrak etanolik kulit jeruk mandarin (*Citrus reticulata*) meningkatkan ekspresi faktor angiogenik VEGF pada sel kanker kolon WiDr. Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC). Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada
- Rafii S. 2002. Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. *J Gene Ther* 9: 631–641
- Ribatti D, Gulantris A, Bastaki M, Vacca A, Iurlaro M, Roncali L, Presta M. 1997, New Model for the Study of Angiogenesis and Antiangiogenesis in the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane: The Gelatin Sponge/Chorioallantoic Membrane Assay, *Journal of Vascular Research* 34:455-463.
- Sugiyanto B, Sudarto, Meiyanto E, Nugroho, AE, Jenie UA. 2003. Aktivitas Antikarsinogenik Senyawa Yang Berasal Dari Tumbuhan. *Majalah Farmasi Indonesia* 14(4): 216-225.
- Tosetti F, Ferrari N, de Flora S, Albini A. 2002, 'Angioprevention': angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents, *FASEB J* 16: 2-14
- Wen-fu T., Li-ping L, Mei-hong L, Yi-Xiang Z, Yun-guang T, Dong X, Jian D. 2002. Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential. *European Journal of Pharmacology* Vol 459: 255-262.