

**Chemopreventive potential of n-hexane fraction of kebiul seeds
(*Caesalpinia bonduc* (L) Roxb.) Bengkulu on chorioallantoic membranes
induced by bFGF**

**Potensi kemopreventif fraksi n-heksan biji kebiul (*Caesalpinia bonduc* (L)
Roxb.) Bengkulu pada chorioallantoic membrane yang diinduksi bFGF**

**Risda Hayati¹⁾ Nadia¹⁾, Amey Putri Karini¹⁾, Ayyu Shavitry¹⁾, Ayu Nadiyah Permatasari
Romdani¹⁾ Septi Wulandari²⁾***

¹⁾Program Sarjana Studi S1 Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Bengkulu, Bengkulu, Indonesia.

²⁾Departemen Biologi Farmasi, Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam, Universitas Bengkulu. Bengkulu, Indonesia.

*e-mail author: septiwulandari@unib.ac.id

ABSTRACT

Cancer is the growth or swelling of a mass of abnormal, uncontrolled and malignant cells. With the formation of these blood vessels, antiangiogenesis is needed because without a blood supply, cancer cells will die. The kebiul seed plant (*Caesalpinia bonduc* (L) Roxb.) contains secondary metabolites as anticancer. This research uses experimental methods, namely making N-Hexane extracts and fractions, Phytochemical Tests, and Antiangiogenesis Tests. The yield of kebiul seeds was 13.608%. In the phytochemical test, the n-hexane fraction of kebiul seeds gave positive results for alkaloids, flavonoids, triterpenoids and tannins. In the blank paper disc group, paper discs with DMSO solvent and paper discs induced by bFGF the average score was 0 (not active). The N-Hexane fraction with a concentration of 02 mg/ml is the most active and has the greatest and best antiangiogenesis effect with an average score of 1.66 (Good), at a concentration of 0.1 mg/ml with an average score of 1.33 (good) and at a concentration of 0.05 mg/ml with an average score of 0.83 (weak). Macroscopic observations showed that kebiul seed extract inhibited the growth of new blood vessels in the bFGF-induced CAM of chicken embryos depending on the concentration given.

Keywords: *Kebiul Seeds, Antiangiogenesis Assay, CAM Methods, Cancer Chemoprevention.*

ABSTRAK

Kanker merupakan pertumbuhan atau pembengkakan massa dari sel yang abnormal, tidak terkontrol, dan bersifat ganas. Adanya pembentukan pembuluh darah tersebut maka dibutuhkan antiangiogenesis karena tanpa suplai darah, sel kanker akan mati. Tanaman biji kebiul (*Caesalpinia bonduc* (L) Roxb.) mengandung metabolit sekunder sebagai antikanker. Riset ini dengan menggunakan metode eksperimental, yaitu pembuatan ekstrak dan fraksi N-Heksan, Uji Fitokimia, dan Uji Antiangiogenesis. Hasil rendemen biji kebiul 13,608%. Pada uji fitokimia fraksi n-heksan biji kebiul memberikan hasil positif untuk alkaloid, flavonoid, triterpenoid, dan tanin. Pada kelompok paper disc blank, paper disc dengan pelarut DMSO dan Paper disc yang diinduksi bFGF skor rata-rata 0 (tidak aktif). Fraksi N-Heksan dengan konsentrasi 02 mg/ml paling aktif

dan efek antiangiogenesisnya paling besar dan bagus dengan skor rata-rata 1,66 (Bagus), pada konsentrasi 0,1 mg/ml dengan skor rata-rata 1,33 (bagus) dan pada konsentrasi 0,05 mg/ml dengan skor rata-rata 0,83 (lemah). Pengamatan makroskopis menunjukkan bahwa ekstrak biji kebiul menghambat pertumbuhan pembuluh darah baru pada CAM embrio ayam yang diinduksi bFGF tergantung konsentrasi yang diberikan.

Kata Kunci: Biji Kebiul, Uji Antiangiogenesis, Metode CAM, Kemoprevensi Kanker.

PENDAHULUAN

Kanker adalah penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan sel-sel dalam tubuh yang progresif dan tidak normal (Hartini *et al.*, 2020). Kanker ini adalah pertumbuhan massa atau pembengkakan sel yang tidak normal, tidak terkendali, dan ganas. Sel-sel kanker akan membentuk angiogenesis pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang sudah ada dan tumbuh serta berkembang sambil kekurangan nutrisi dan oksigen. (Iqbal *et al.*, 2020). Ketika pembuluh darah terbentuk, sel kanker mati tanpa suplai darah sehingga diperlukan antiangiogenesis dengan tujuan memberhentikan pembentukan pembuluh darah baru. (Yusuf dan Alaydrus, 2020). Hingga sekarang pengobatan kanker yang dilakukan memberikan efek samping yang tidak diinginkan berhubungan dengan permasalahan fisik & psikologi (Hartini *et al.*, 2020). Oleh sebab itu, diperlukan solusi lain, yaitu dengan menggunakan obat-obatan dari tanaman tradisional yang memiliki potensi sebagai anti kanker untuk meminimalkan efek samping tersebut (Haryoto dan Putri, 2019).

Indonesia mempunyai kurang lebih 30.000 jenis tumbuhan, 940 diantaranya dimanfaatkan sebagai tumbuhan obat. Pemanfaatan tumbuhan obat untuk obat tradisional ialah pilihan terapi yang semakin dipilih saat ini, terutama dari sudut pandang *back-to-nature* dan dikarenakan obat tradisional ini relatif aman dan murah, namun walaupun dengan perkembangan saat ini, layanan pengobatan alternatif semakin mendapat perhatian. Berkat berbagai penelitian, pengobatan tradisional telah mendapat pengakuan di masyarakat lokal, meningkatkan manfaat tanaman sebagai kesehatan dan membuat kondisi yang kondusif untuk perkembangan pengobatan tradisional. (Surbakti *et al.*, 2018).

Salah satu tumbuhan obat tradisional adalah tumbuhan Kebiul (*Caesalpinia Bonduc* (L) Roxb) yang mana bijinya dimanfaatkan sebagai obat oleh masyarakat setempat. *Caesalpinia Bonduc* (L) Roxb juga sebagian besar ditemukan di Pulau

Sumatera, khususnya di wilayah Bengkulu. Masyarakat Bengkulu memanfaatkan tumbuhan Kebiul (*Caesalpinia Bonduc* (L) Roxb) sebagai obat atau bijinya yang berkhasiat sebagai obat untuk mengobati berbagai penyakit yaitu malaria, sakit perut, batu ginjal, diabetes, hernia, dan kanker. (Malviya dan Malviya, 2017). Tumbuhan biji kebiul (*Caesalpinia bonduc* (L) Roxb.) ini terkandung metabolit sekunder sebagai sebagai antikanker.

Penggunaan biji kebiul (*Caesalpinia bonduc* (L) Roxb) ini didukung dengan beberapa riset sebelumnya yang menyatakan bahwa jika dibandingkan dengan obat antikanker yang sudah ada, energi pengikatnya sangat sebanding serta interaksinya dengan protein (Iheagwam *et al.*, 2019). Riset lain juga menyatakan bahwa fraksi etil asetat biji kebiul mempunyai sifat antioksidan dan efek penghambatan terhadap sel kanker. Efek tersebut berkaitan dengan adanya metabolit sekunder, terutama flavonoid (Pournaghi *et al.*, 2021).

Berdasarkan uraian di atas maka perlu dilakukan riset lebih lanjut mengenai potensi kemopreventif fraksi n-heksan biji kebiul (*Caesalpinia bonduc* (L) Roxb.) yang diinduksi dengan *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) dengan harapan dapat mengeksplorasi lebih jauh mengenai manfaat dari tanaman daerah Bengkulu, yaitu biji kebiul (*Caesalpinia bonduc* (L) Roxb.).

METODE PENELITIAN

Bahan Kimia dan Reagen

Semua bahan kimia dan pelarut etanol 96%, etanol 70%, N-Heksan, NaCl 0,9%, Larutan Iodium, Aquadest Steril, Aquabidest Steril, NaOH, H₂SO₄, kloroform, fEcl₃, Hcl, Phosphate Buffer Saline (PBS), Dimethyl Sulfoxide, Paraffin Solidum.

Bahan Tanaman

Biji Kebiul simplisia biji kebiul (*Caesalpinia bonduc* (L) Roxb.) di diperoleh dari Kabupaten Bengkulu Selatan, Provinsi Bengkulu.

Pembuatan Ekstrak dan Fraksi

Biji kebiul (*Caesalpinia bonduc* (L) Roxb.) yang sudah dikumpulkan, dikumpulkan dicuci dengan menggunakan air mengalir yang bertujuan menghilangkan kotoran yang ada pada biji kebiul (*Caesalpinia bonduc* (L) Roxb.) tersebut. Kemudian biji kebiul yang telah dibersihkan dikeringkan pada oven dengan suhu 50°C. Sebanyak 300 gram serbuk simplisia biji kebiul (*Caesalpinia bonduc* (L) Roxb.) ditimbang dan dituang kedalam bejana maserasi setelah itu ditambah fraksi n-heksan sebanyak 600 mL kemudian dicampur hingga homogen. Campuran tersebut dimaserasi selama 3 x 24 jam pada suhu ruangan selanjutnya disaring menggunakan kertas Whatman filter dengan corong Buchner dan filtrat diuapkan pelarutnya hingga diperoleh fraksi n-heksan biji kebiul (*Caesalpinia bonduc* (L) Roxb.) pada suhu 50°C.

Uji Alkaloid

Sejumlah sampel fraksi N-Heksan biji kebiul diambil dan diletakkan dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan dengan pereaksi wagner. Positif alkaloid ditandai dengan adanya endapan berwarna coklat.

Uji Flavonoid

Sejumlah sampel fraksi N-Heksan biji kebiul diambil dan diletakkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 0,05 gr Magnesium, 0,2 ml larutan asam-alkohol, dan 2 ml amil alkohol. Positif flavonoid ditandai dengan adanya warna merah/kuning di lapisan amil alkohol.

Uji Triterpenoid

Ekstrak sejumlah 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 ml etanol 70% dan diaduk, ditambahkan 2 ml kloroform, dan ditambahkan pelan-pelan melalui dinding tabung reaksi H₂SO₄ pekat sebanyak 2 ml pada lemari asam. Pembentukan cincin biru kehijauan menunjukkan adanya triterpenoid. Sedangkan pembentukan cincin kecoklatan atau violet menunjukkan adanya triterpenoid.

Uji Tanin

Ekstrak sejumlah 0,5 gram dimasukkan pada dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 ml etanol 70% dan diaduk, ditambahkan FeCl₃ sebanyak 3 tetes. Ciri khas warna biru, biru kehitaman, hijau, atau biru kehijauan serta terbentuknya endapan menunjukkan adanya tanin.

Uji Antiangiogenesis

Telur diinkubasi dalam inkubator laboratorium pada minimal 1 hari sebelum perlakuan, telur diinkubasi dalam inkubator laboratorium bersuhu 37°C untuk beradaptasi dengan lingkungan baru. Telur ayam umur 5 hari diberi perlakuan. Langkah pengobatan pertama adalah dengan menggunakan alkohol 70 persen untuk menghilangkan kotoran pada cangkang telur. Posisi embrio ditentukan dengan menyinari sel telur. Selanjutnya, buat lubang kecil di ruang udara dan gunakan bor mini dan pisau bedah untuk membuat skor pada area persegi panjang (jendela). Subjek berbentuk oval dibagi secara acak menjadi enam kelompok (setiap perlakuan terdiri dari tiga butir telur) sebagai berikut:

- Kelompok I diimplantasikan *paper disc*.
- Kelompok II diimplantasikan *paper disc* + pelarut (dimethyl sulfoxide - aquadest steril).
- Kelompok III kelompok kontrol *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) + pelarut diimplantasikan *paper disc* termuati *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) 10 mg + pelarut (dimethyl sulfoxide aquadest steril) sebanyak 10 µl.
- Kelompok IV, V dan VI merupakan telur yang digunakan untuk melihat efek penghambatan fraksi n-heksan biji kebiul (*Caesalpinia bonduc* (L) Roxb.) dengan 3 variasi konsentrasi (0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml dan 0,2 mg/ml). Kelompok ini adalah kelompok telur implantasi *paper disc* termuat bFGF 10 mg + larutan fraksi n-heksan biji kebiul (*Caesalpinia bonduc* (L) Roxb.) dengan masing-masing konsentrasi sebanyak 10 µl.

Setelah dilakukan perlakuan, lubang kecil dan lubang berbentuk persegi panjang di daerah kutub ditutup dengan parafin padat yang dicairkan. Telur dibuka dengan cara membelah kulit telur menjadi dua pada umur 7 hari. Membran korioallantois yang menempel pada bagian cawan berisi kertas cakram diamati secara visual. Gambar permukaan CAM yang sama dari sampel uji yang sama (sebelum dan sesudah perawatan) dibandingkan, dan efek anti-angiogenik dihitung hanya pada area CAM yang ditutupi oleh cakram kosong (Burgermeister *et al.*, 2002; Krenn and Paper, 2009 dalam Seow *et al.*, 2011) dengan skala 0-2 digunakan untuk penilaian (lihat Tabel 2).

Analisis Data

Data dinyatakan sebagai rata-rata ± Signifikansi statistik SD dianalisis menggunakan uji *one way* ANOVA. Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan SPSS for Windows.

HASIL DAN DISKUSI

Rendemen berat ekstrak yang diperoleh dibandingkan dengan berat Simplisia yang diekstraksi kemudian dikalikan 100%. Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dan pelarut etanol. Penggunaan metode maserasi ini dikarenakan metode ini mempunyai alat yang praktis dan mudah dalam pengolahannya, serta karena bahannya sudah halus dilihat dari struktur sampel yang digunakan. (Mustapa *et al.*, 2020). N-Heksan merupakan pelarut yang mampu menarik senyawa alkaloid. Alkaloid memiliki aktivitas antiangiogenik dan bertindak melalui beberapa mekanisme yang menghambat angiogenesis. Hampir semua alkaloid menunjukkan aktivitas antiproliferatif dan sitotoksik terhadap beberapa lini sel kanker asal histologis yang berbeda (kerongkongan, lambung, usus besar, hati, paru-paru, payudara, tulang, dan otak), dan aktivitas ini tergantung juga pada aktivasi ekspresi gen apoptosis (Alasvand *et al.*, 2019).

Rendemen sampel biji kebiul (*Caesalpinia Bonduc* L.) sebanyak 250 gram simplisia menghasilkan ekstrak sebanyak 34,02 gram dan hasil rendamen 13,608%. Menurut Depkes RI (2000), Persentase ini berada dalam kisaran persentase seduhan yaitu 10-15% yang menunjukkan bahwa proses ekstraksi sudah berjalan sempurna.

Tanaman biji kebiul (*Caesalpinia bonduc* (L) Roxb.) ini mengandung metabolit sekunder sebagai sebagai antikanker. Pada uji fitokimia fraksi n-heksan biji kebiul menunjukkan hasil skrining fitokimia menunjukkan hasil positif pada senyawa alkaloid, flavonoid, triterpenoid, dan tanin. Pada senyawa alkaloid memiliki aktivitas antiangiogenik dan bertindak melalui beberapa mekanisme yang menghambat angiogenesis. Hampir semua alkaloid menunjukkan aktivitas antiproliferatif dan sitotoksik terhadap beberapa lini sel kanker asal histologis yang berbeda (kerongkongan, lambung, usus besar, hati, paru-paru, payudara, tulang, dan otak), dan aktivitas ini tergantung juga pada aktivasi

ekspresi gen apoptosis (Alasvand *et al.*, 2019). Kelarutan alkaloid ini banyak terlarut dalam pelarut n-heksan, hasil uji skrining fitokimia dengan menggunakan pelarut n-heksan menghasilkan adanya kandungan jenis senyawa alkaloid (Iffah *et al.*, 2018). Dapat dilihat hasil uji fitokimia pada Tabel. 1.

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia

Uji Fitokimia	Hasil
Uji Alkaloid	Positif (+)
Uji Flavonoid	Positif (+)
Uji Triterpenoid	Positif (+)
Uji Tanin	Positif (+)

Aktivitas anti-angiogenik ekstrak dan fraksi N-Heksan biji kebiul (*Caesalpinia bonduc* (L) Roxb) diperiksa menggunakan uji CAM, dan *basic Fibroblast Growth Factors* (bFGF) digunakan sebagai kontrol positif untuk uji tersebut. Untuk evaluasi efek anti-angiogenik, sistem skor semi kuantitatif digunakan.

Pada kelompok kontrol, diamati tidak adanya perubahan pada pembuluh darah di bawah paper disc yang diberikan pelarut DMSO serta paper disc blank dengan skor rata-rata 0. Sebuah CAM yang diberikan paper disc blank, paper disc dengan penambahan pelarut DMSO, dan paper disc yang diinduksi bFGF ditunjukkan pada gambar 1A, 1B, dan 1C. Namun pada paper disc yang diinduksi bFGF.

Diantara konsentrasi fraksi N-Heksan yang digunakan, fraksi dengan konsentrasi 02 mg/ml paling aktif dan efek antiangiogenesisnya paling besar dan bagus dengan skor rata-rata 1,66. Setelah 48 jam treatment, pola percabangan pembuluh darah di bawah paper disc yang mengandung fraksi n-heksan (0,2 mg/ml) menurun sangat drastis, pembuluh darah besar yang sudah ada sebelumnya jelas terlihat Gambar. 1F. Seperti yang ditunjukkan pada Gambar. 1E, yaitu fraksi n-heksan (0,1 mg/ml), adanya perubahan pembuluh darah yang juga sedikit menurun dengan skor rata-rata 1,33. Fraksi n-heksan dengan konsentrasi 0,05 mg/ml memiliki penurunan pembuluh darah yang paling sedikit dan paling diantara konsentrasi fraksi n-heksan lainnya dengan skor rata-rata 0,83, dapat dilihat pada gambar 1D.

Tabel 2 Sistem skor semi kuantitatif untuk evaluasi efek antiangiogenesis pada CAM

Skala	Efek Antiangiogenesis	Efek diamati pada CAM setelah perawatan
0	Tidak Aktif	Tidak ada perubahan
0,5	Lemah	Perubahan kecil pada pembuluh darah
1	Bagus	Area bebas kapiler kecil di bawah disk ; beberapa pembuluh mikro menyatu atau pertumbuhan pembuluh darah sedikit berkurang
2	Kuat	Bebas kapiler di bawah paper disc ; pembuluh mikro tidak lagi terlihat dan konvergensi pembuluh besar

Tabel 3. Efek Antiangiogenesis

Sampel	Konsentrasi (mg/ml)	Skor Rata-rata	Efek Antiangiogenesis
Paper Disc Blank	0	0±0,00	Tidak Aktif
Paper Disc + Pelarut	0	0±0,00	Tidak Aktif
Paper Disc + bFGF	10	0±0,00	Tidak Aktif
Fraksi N-Heksan	0,05	0,83±0,28	Lemah
Fraksi N-Heksan	0,1	1,33±0,57	Bagus
Fraksi N-Heksan	0,2	1,66±0,57	Bagus

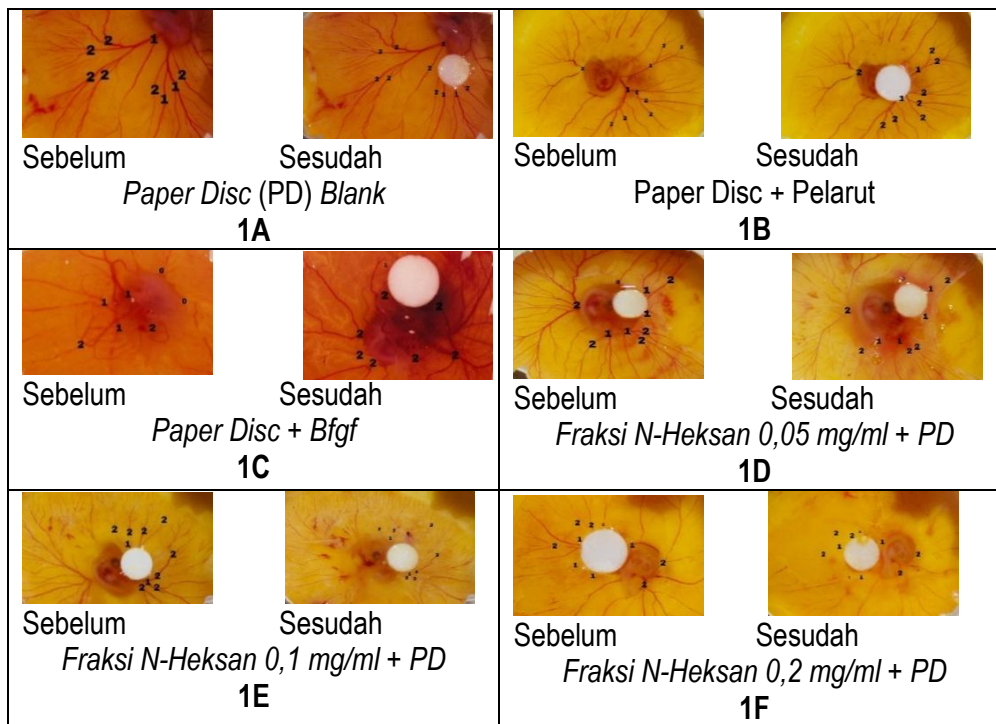
Strategi anti-angiogenik yang ditujukan untuk menghambat proliferasi sel endotel, mengganggu adhesi dan migrasi sel endotel, dan mengganggu metalloproteinase saat ini sedang berkembang (Griffioen dan Molema, 2000). Dalam penelitian ini, aktivitas antiangiogenik ekstrak N-Heksan biji kebiul (*Caesalpinia bonduc (L) Roxb*) dan fraksinya dievaluasi secara *in vivo* menggunakan uji membran chorioallantoic membrane (CAM) embrio ayam.

Chorioallantoic-membrane (CAM) merupakan model mapan untuk penelitian kanker *in vivo*. Menggunakan CAM untuk penelitian kanker memiliki keuntungan yang jelas, seperti efisiensi waktu dan biaya serta ketersediaan luas yang menghasilkan output kuantitatif yang tinggi dan peningkatan reproduktivitas (Eckrich *et al.*, 2020). Kuantifikasi perubahan pembuluh darah pada CAM sebagai respons terhadap penghambatan angiogenesis disederhanakan dengan membandingkan gambar pembuluh CAM sebelum dan sesudah treatment dengan atau tanpa pemberian zat uji.

Perubahan kualitatif yang berbeda dalam kapiler untuk setiap zat uji diamati dan digunakan untuk menghitung skor efek anti-angiogenik dari fraksi n-heksan biji kebiul. Dalam penelitian ini,

diamati bahwa area CAM di paper disc yang mengandung pelarut DMSO (kontrol) tidak menunjukkan perubahan kepadatan pembuluh darah. Pola percabangan pembuluh darah yang normal menunjukkan bahwa paper disc dan pelarut DMSO tidak mempengaruhi pertumbuhan pembuluh darah.

CAM yang diobati dengan fraksi n-heksan mengurangi pertumbuhan pembuluh darah dan menunjukkan efek anti-angiogenik yang kuat. Di antara konsentrasi fraksi n-heksan, Kelompok 6 (Konsentrasi 0,2 mg/ml) memiliki efek antiangiogenik yang besar, menyiratkan bahwa sampel uji aktif ini mengandung antiangiogenesis. Angiogenesis berperan penting dalam pertumbuhan sel kanker. Pembuluh darah yang baru terbentuk memasok sel-sel kanker dengan oksigen dan nutrisi, memungkinkan sel-sel ini tumbuh. Akibatnya, penghambatan angiogenesis dapat menyebabkan kontrol pertumbuhan kanker. Studi kami menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi n-heksan biji kebiul menghambat pertumbuhan pembuluh darah. Oleh karena itu, masuk akal untuk menyarankan bahwa senyawa alkaloid yang hadir dalam konsentrasi tinggi dalam sampel aktif yang terdeteksi pada uji fitokimi mungkin bertanggung jawab atas aktivitas antiangiogeniknya.



Gambar 1. Hasil dari Metode CAM. Skala penentuan efek antiangiogenik ditandai dengan perubahan kepadatan pada pembuluh darah setelah diberikan perlakuan.

KESIMPULAN

Sebagai kesimpulan, ekstrak dan fraksi n-heksan biji kebiul menunjukkan aktivitas antiangiogenik yang kuat dengan uji CAM in vivo. Pengamatan makroskopis menunjukkan bahwa ekstrak tersebut menghambat pertumbuhan pembuluh darah baru pada CAM embrio ayam yang diinduksi bFGF tergantung konsentrasi yang diberikan. Senyawa alkaloid yang hadir dalam konsentrasi tinggi dalam sampel aktif mungkin bertanggung jawab atas aktivitas anti-angiogeniknya. Temuan ini menyarankan dasar yang mungkin untuk potensi penggunaan biji kebiul dalam penghambatan angiogenesis. Temuan mungkin memberikan latar belakang farmakologi pada penggunaan tradisional tanaman untuk perlindungan terhadap kanker.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Direktorat Pembelajaran dan Kemahasiswaan (Belmawa) dan UPT PKM Universitas Bengkulu telah mendanai penelitian melalui program Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) Tahun 2023.

REFERENSI

- Alam, S., Katiyar, D., Goel, R., Vats, A. dan Mittal, A. (2013). *Role of herbals in cancer management. The Journal of Phytopharmacology*, 2(6), 46-51.
- Alasvand, M., Assadollahi, V., Ambra, R., Hedayati, E., Kooti, W., & Peluso, I. (2019). *Antiangiogenic effect of alkaloids. Oxidative medicine and cellular longevity*.
- Bruguiera, T. (2020). *Ekstrak Kulit Batang Tumbuhan Mangrove (Avicennia marina) Terhadap Sel T47d Dan Mcf7. Skripsi. Universitas Muhammadiyah Surakarta*.
- Eckrich, J., Kugler, P., Buhr, C. R., Ernst, B. P., Mendler, S., Baumgart, J., ... & Wiesmann, N. (2020). *Monitoring of tumor growth and vascularization with repetitive ultrasonography in the chicken chorioallantoic-membrane-assay. Scientific reports*, 10(1), 18585.
- Global Cancer Observatory. (2020). *Estimated number of new cases in 2020, Mexico, both sexes, all ages, World Health Organization*.
- Hafsah, L. (2022). *Gambaran Tingkat Kecemasan Pada Pasien Kanker Yang Menjalani Kemoterapi Di Rsud Dr. M.Yunus*

- Bengkulu. *Jurnal Vokasi Keperawatan (JVK)*, 5(1), 21-28.
- Hartini, S. , W. B. D. , & N. E. G. Z. (2020). *Peningkatan Pengetahuan Perawat Untuk Perawatan Anak Penderita Kanker. Jurnal Pengabdian Kesehatan*, 3(2), 141-149.
- Haryoto dan Putri, S. P. (2019). *Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol, Fraksi Heksan, Etil Asetat Dan Etanol-Air Dari Daun Mangrove Tancang (Bruguiera gymnorrhiza) Terhadap Sel Kanker Payudara. Proceeding of the 10th University Research Colloquium 2019. Bidang MIPA dan Kesehatan*, 177–183.
- Iffah, A. A. D., & Samawi, M. F. (2018). *Skrining metabolit sekunder pada sirip ekor hiu Carcharhinus melanopterus. Prosiding Simposium Nasional Kelautan Dan Perikanan*, 5.
- Iheagwam, F. N., Ogunlana, O. O., Ogunlana, O. E., Isewon, I. dan Oyelade, J. (2019). *Potential anti-cancer flavonoids isolated from Caesalpinia bonduc young twigs and leaves: molecular docking and in silico studies, Bioinformatics and Biology Insights* 13.
- Iqbal, M., Yusuf, M., Herman, H. dan Emelda, A. (2020). *Uji Efek Antiangiogenesis Menggunakan Metode Chorio Allantoic Membrane dari Ekstrak Etanol Daun Talas (Colocasia esculenta L. Schott), Sasambo. Journal of Pharmacy* 1(2), 51-56.
- Kumar V, Cotran RS, dan Robbins SL. (2013). *Buku Ajar Patologi Volume 1. Edisi VII, Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta*
- Malviya, N., dan M. S. (2017). *Bioassay guided fractionation-an emerging technique influence the isolation, identification and characterization of lead phytomolecules. Hosp, Pharm*, 2(5).
- Miranti, L. F. Y. dan A. Nurdini. (2014). *Uji Potensi Anti Kanker Ekstrak Biji Pinang Merah dan Implementasinya dalam Pembelajaran Mitosis*.
- Mondal, A., Gandhi, A., Fimognari, C., Atanasov, A. G. dan Bishayee, A. (2019). *Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives, European journal of pharmacology*.
- Mustafida, R. Y., Munawir, A. dan Dewi, R. 2014. *Efek antiangiogenik ekstrak etanol buah mahkota dewa (Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl.) pada Membran Korio Alantois (CAM) Embrio Ayam. Pustaka Kesehatan* 2(1),4-8.
- Mustapa, M. A., Abdulkadir, W., & Halid, I. F. (2020). *Standarisasi Parameter Spesifik Ekstrak Metanol Biji Kebiul (Caesalpinia Bonduc L.) Sebagai Bahan Baku Obat Herbal Terstandar. Journal Syifa Sciences and Clinical Research*, 2(1), 49-58.
- Pournaghi, N., Khalighi-Sigaroodi, F., Safari, E., & Hajjaghaee, R. (2021). *Bioassay-guided isolation of flavonoids from Caesalpinia bonduc (L.) roxb. and evaluation of their cytotoxicity. , Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 20(1), 274.
- Rahmah, W. (2021). *Potensi Tanaman Mangrove Sebagai Agen Antikanker:Literature Review. Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia*. 10(1), 12-16.
- Seow, L. J., Beh, H. K., Majid, A. M. S. A., Murugaiyah, V., Ismail, N., & Asmawi, M. Z. (2011). *Anti-angiogenic activity of Gynura segetum leaf extracts and its fractions. Journal of ethnopharmacology*, 134(2), 221-227.
- Surbakti, P. A. A. (2018). *Skrining fitokimia dan uji toksisitas ekstrak etanol daun binahong (androdera cordifolia (ten.) steenis) dengan metode brine shrimp lethality test (bslt), Pharmacon*, 7(3).
- Winanti, N. A., Martiyaningsih, D. P., Soemedhy, C. A. A., & Athiyah, U. (2023). *Analisis Klasifikasi Citra Kanker Kulit dengan Random Forest, REMIK:Riset dan E-Jurnal Manajemen Informatika Komputer*. 7(1), 506-515.
- Yang, L., Zhang, J., Wang, C., Qin, X., Yu, Q., Zhou, Y. dan Liu, J. (2014). *Interaction between 8-hydroxyquinoline ruthenium (II) complexes and basic fibroblast growth factors (bFGF): inhibiting angiogenesis and tumor growth through ERK and AKT signaling pathways. Metallomics* 6(3), 518-531.
- Yani, D. F. dan D. R. (2021). *Uji Aktivitas Fraksi Metanol Dan N- Heksan Kulit Dan Kernel Biji Kebiul (Caesalpinia bonduc L.) Sebagai Tabir Surya Activity Test of Methanol And N-Hexan Fraction of Coat and Kernel Seed (Caesalpinia bonduc L.) As A Sun Screen. J. Sains Dasar* 1-5.

- Yanty, Y. N., Sopianti, D. S. dan Veronica, C. (2019). *Fraksinasi dan Skrining Fraksi Biji Kebiul (Caesalpinia bonduc (L) Roxb) Dengan Metode Klt (Kromatografi Lapis Tipis) Fraction and Screening of Fresh Seed (Caesalpinia bonduc (L) Roxb) Seeds with KLT Method (Thin Lapis Chromatography)*. *Borneo Journal of Pharmascientech* 3(1).
- Yusuf, M. dan A. R. *Uji antiangiogenesis secara in vivo ekstrak etanol biji kopi robusta (Coffea robusta) dengan Metode Chorio Allantoic Membrane (CAM)*, *Galenika Journal of Pharmacy*. 6(1), 63-69.