

Isolasi dan identifikasi *eurycomanone* akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia*, Jack) serta uji anti-angiogenik

Isolation and identification of *eurycomanone* from akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia*, Jack) and its anti-angiogenic activity

Nina Salamah¹, Sugiyanto^{1*}, Mae Sri Hartati², Farida Hayati³ dan Pinus Jumariyatno³

¹Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada,

²Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada,

³Progdi Farmasi Universitas Islam Indonesia

Abstrak

Pasak bumi (*Eurycoma longifolia*, Jack) adalah salah satu tanaman asli Indonesia yang memiliki potensi anti kanker. Salah satu kandungan akar pasak bumi, yaitu *eurycomanone* telah terbukti bersifat sitotoksik pada kultur sel kanker A-549, MCF-7, fibrosarcoma, melanoma, kanker kolon dan dapat menginduksi apoptosis pada Sel HeLa. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi dan identifikasi *eurycomanone* dari akar pasak bumi serta menguji aktivitas anti angiogeniknya pada membran korio alantois (CAM) embrio ayam yang terinduksi bFGF.

Serbuk akar pasak bumi dimaserasi dengan metanol kemudian difraksinasi menggunakan *Vacuum Liquid Chromatography* (VLC) diperoleh 6 fraksi. Profil KLT fraksi ke 2 mengandung bercak dengan Rf sama dengan eurykumanon dan satu bercak lain berfluoresensi biru di bawah UV 254 nm. Fraksi ke 2 diisolasi menggunakan KLT preparatif, dihasilkan isolat A. Uji anti angiogenik terhadap isolat A kadar (5, 10, 15, 20, 40) µg/mL dilakukan pada telur berembrio umur 8-9 hari yang dibagi dalam delapan kelompok perlakuan. Kelompok I kontrol *paper disc*, kelompok II kontrol bFGF, kelompok III kontrol bFGF + pelarut DMSO 0,8 %, kelompok IV, V, VI, VII dan VIII kelompok uji penghambatan angiogenesis, diberi bFGF 10 ng dan larutan uji. 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.

Identifikasi struktur berdasarkan data spektra UV, IR, ¹H NMR, ¹³C NMR dan MS menunjukkan bahwa isolat A merupakan senyawa *eurycomanone*. *Eurycomanone* dapat menghambat angiogenesis pada CAM yang terinduksi bFGF mulai kadar 10 µg/mL.

Kata kunci: antiangiogenik, angiogenesis, *E. longifolia*, *eurycomanone*, CAM.

Abstract

Pasak bumi is one of the Indonesian original plants having anti cancer activity. One compound of akar pasak bumi, i.e *eurycomanone* was proven to have cytotoxic effect on cancer cell culture by apoptosis induction on HeLa cells. Therefore, this study was aimed to isolate and identify *eurycomanone* from akar pasak bumi and to look at the anti angiogenic activity of the compounds on corio alantois membrane (CAM) of chicken embryo induced by bFGF.

The akar pasak bumi was ground and was macerated with methanol. The macerate was fractioned by mean of VLC. Six fractions was obtained. The second fraction exhibited two spots on a TLC system, one spot was cochromatographed with *eurycomanone* as the reference standart and another spot exhibited blue fluorecence at 254 nm. This second fraction, then, was chromatographed on a

preparative scale TLC to separate isolate A. Anti angiogenic test was performed for Isolate A at concentration series of 5, 10, 15, 20, 40 µg/mL respectively. Egg embryo (8-9 days) were divided into 8 groups. The first group was implanted paper disc only, the second group were given bFGF on Tris HCl buffer and the third group were given bFGF (on Tris HCl buffer) + 0,8 % DMSO. The fourth to eighth group were induced by 10 ng bFGF and the test preparation at the respective concentration. After incubation at 39 °C for 3 days, each egg was opened, the content of each was aspired and discarded, the CAM stucked to its shell was examined macroscopically and microscopically for the formation of new blood vessels.

Based on spectral data of UV, IR, ¹H NMR, ¹³C NMR and MS of isolate A and comparison with the spectral data of the standart, the isolate A was eurycomanone. *Eurycomanone* inhibited angiogenesis at concentration of 10 µg/mL.

Key words: antiangiogenic, angiogenesis, *E.longifolia*, *eurycomanone*, CAM.

Pendahuluan

Pemanfaatan obat alam sebagai salah satu alternatif obat kanker sedang banyak dieksplorasi. Pasak bumi (*Eurycoma longifolia*, Jack) merupakan salah satu tanaman asli Indonesia yang memiliki potensi anti kanker (Sengupta *et al.*, 2004). Salah satu strategi penghambatan perkembangan kanker adalah dengan menghambat proses angiogenesis. Suatu agen kimia yang mempunyai kemampuan menghambat angiogenesis akan berpotensi besar dalam terapi kanker, antara lain dalam meningkatkan efektifitas kemoterapi (Jing *et al.*, 2006).

Sel kanker tumbuh dan berkembang dengan mengambil nutrisi dan oksigen dari inang (*host*) dengan cara membentuk pembuluh darah baru (angiogenesis). Penghambatan proses angiogenesis dari kanker menyebabkan sel kanker mengalami penghambatan pertumbuhan, kelaparan dan akhirnya mati (Hanahan and Weinberg, 2000). Saat ini terapi antiangiogenesis merupakan pendekatan yang menjanjikan dalam upaya membuat terobosan terapi kanker dan penyakit proangiogenik lainnya (O'Reilly *et al.*, 1994).

Penelitian akar pasak bumi sebagai antikanker, menunjukkan bahwa ekstrak metanol akar pasak bumi sitotoksik terhadap kultur sel HeLa dengan nilai IC₅₀ = 46,9 - 58,6 µg/mL (Mustofa dan Qamariah, 2004). *Eurycomanone*, suatu golongan quasinoid

merupakan salah satu senyawa yang terdapat dalam akar pasak bumi

telah dibuktikan menginduksi apoptosis pada kultur sel HeLa (Nurkhasanah and Pihie, 2006) dan sitotoksik terhadap kultur sel KB (Chan *et al.*, 2004). Beberapa penelitian yang telah dilakukan terhadap komponen hasil isolasi akar pasak bumi, umumnya terfokus pada efek sitotoksiknya, sehingga perlu dilakukan penelitian dengan titik tangkap aksi yang berbeda, salah satunya adalah uji anti angiogenesis. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa berpotensi anti angiogenesis akar pasak bumi pada CAM embrio ayam yang terinduksi bFGF.

Metodologi

Bahan

Akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) berasal dari Hutan Taman Pendidikan Fakultas Kehutanan Universitas Lambung Mangkurat, Banjar baru, Kalimantan Selatan, merupakan pemberian dari dosen Fakultas Farmasi Universitas Lambung Mangkurat. Senyawa pembanding *eurycomanone* dibeli dari Cromadex inc. Pelarut untuk isolasi adalah metanol dan kloroform berderajat pro analisa serta aquadest. Silika gel GF 254 untuk KLT preparatif, dibeli dari E. Merck. Induktor angiogenesis yang digunakan adalah *recombinant human* bFGF 1ng/µL dibeli dari Sigma dengan nomor produksi F 0291. Membran korio alantois (CAM) embrio ayam berasal dari telur ayam SPF berumur 8 hari, dibeli di Pusat Veterinaria Farma Surabaya. Bahan kimia yang lain adalah DMSO 0,8 %, larutan buffer Tris-HCL

10mM pH 7,5, etanol 70 %, formalin 10 %, NaCl 0,9 %, aquadest steril dan hemaktosilin-eosin (HE).

Jalannya Penelitian

Identifikasi dan isolasi 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. Identifikasi ini untuk memastikan bahwa yang diteliti benar akar dari tanaman pasak bumi.

Serbuk akar pasak bumi 200 gram diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan 500 mL pelarut metanol selama 24 jam disaring dengan corong Buchner. Maserasi diulang sebanyak 5 kali, sari metanol dievaporasi hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak metanol difraksinasi dengan VLC (*Vacuum Liquid Chromatography*) dengan fase diam silika gel dan fase gerak dengan tingkat kepolaran yang semakin besar, berturut-turut yaitu: kloroform-metanol-air dengan perbandingan 5:5:1, 3:7:1, 1:9:1, sehingga diperoleh 6 fraksi. Seluruh fraksi dimonitor kandungan kimianya dengan KLT menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dengan fase gerak CHCl₃ : MeOH : H₂O = 6,5 : 2,5 : 0,4 menggunakan pembanding *eurycomanone*. Fraksi kedua dipurifikasi menggunakan KLT preparatif dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak CHCl₃ : MeOH : H₂O = 6,5 : 2,5 : 0,4 deteksi dengan lampu UV 254 nm. Senyawa hasil isolasi disebut isolat A dan isolat B. Isolat A mengakibatkan pemataman pada UV 254 nm. Isolat A selanjutnya diidentifikasi struktur senyawanya dengan metode spektrometri UV, IR, NMR dan Massa kemudian hasil interpretasi spektra dibandingkan dengan pustaka.

Uji Anti Angiogenesis

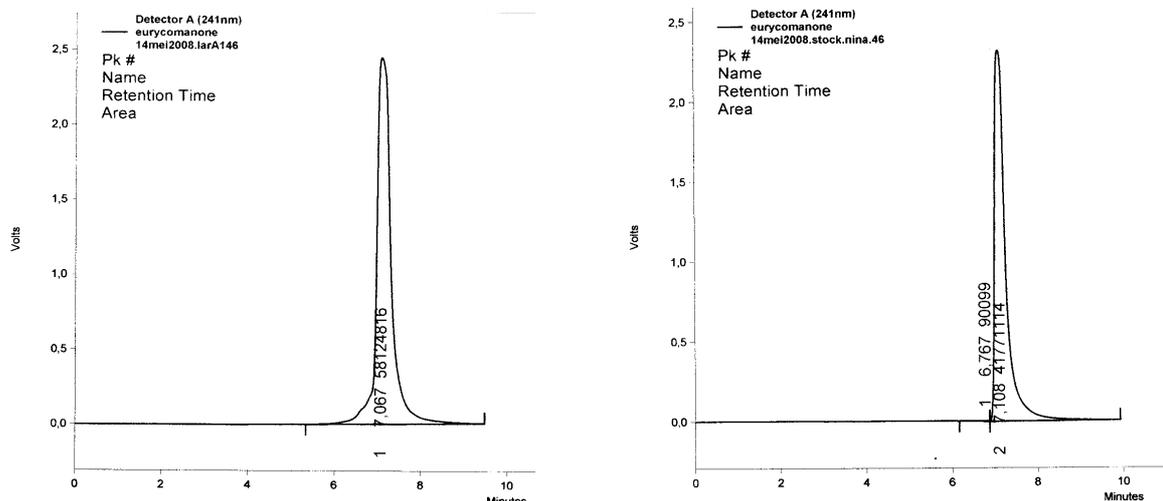
Semua peralatan yang akan digunakan untuk uji anti angiogenesis disterilisasi dengan autoclav, suhu 121 °C selama 15-30 menit.

Preparasi *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) sebagai induktor angiogenesis yang digunakan sebanyak 25 µg, dibuat stok kadar 50 ng/µL menggunakan larutan Tris-HCL 10 mM pH 7,5 kemudian diencerkan sehingga didapat kadar 1 ng/µL. 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)

Isolat A 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 udara dan kerabang di atas embrio disucikan 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



Gambar 1. Hasil elusi HPLC: I. Isolat A, tR = 7,067 II. Pembanding eurycomanone, tR = 7,108 fase diam silika, fase gerak kloroform : metanol = 4:6 dan kecepatan alir 0,5 mL/menit.

gergaji (*mini drill*) untuk membuat lubang segi empat dengan luas 1 cm². Melalui lubang ini bFGF dan isolat 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 isolat A.

Telur pada kelompok perlakuan ini diberi implantasi *paper disc* ditambah bFGF 10 ng + isolat A, dengan variasi kadar.

Setelah diberi perlakuan, telur diinkubasi pada suhu 39 °C dengan kelembaban relatif 60 % selama 3 hari atau 72 jam (Ribatti *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 isolat A. 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* (penambahan bFGF dan isolat uji), kemudian diubah dalam skor. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan uji Kruskal Wallis dan Mann Whitney. Pengamatan secara

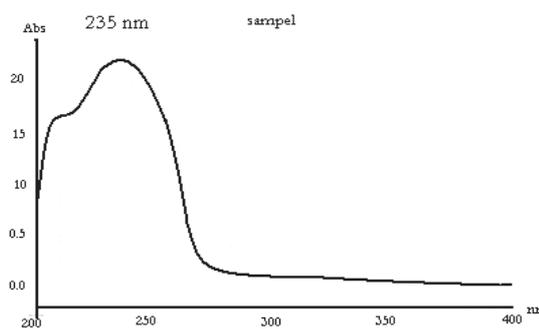
mikroskopik dilakukan dengan mengamati preparat histologi CAM.

Hasil dan Pembahasan

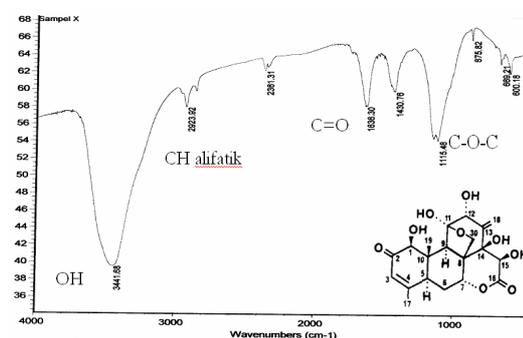
Uji kemurnian isolat A dengan KLT hanya muncul satu bercak dengan Rf yang sama dengan pembanding *eurycomanone* dan dengan menggunakan HPLC fase normal (HPLC shimadzu LC 6 A, kolom Shimpack dengan *internal diameter* 6 mm dan panjang 15 cm, diameter silika 5 µm), puncak dari isolat A memiliki waktu retensi yang sama dengan waktu retensi pembanding *eurycomanone*. Data HPLC tersaji pada Gambar 1.

Isolat A diuji *melting pointnya* (mp) adalah 252-254 °C sedangkan *eurycomanone* sebagai senyawa pembanding memiliki nilai mp 254-255 °C (Kardono *et al.*, 1991).

Spektroskopi UV yang digunakan untuk identifikasi isolat A adalah Spectro UV/Vis Hitachi *double beam* U-2800, *scan speed* : 800 nm/min. Pada spektra UV isolat A (Gambar 2) menunjukkan adanya 1 peak dengan panjang gelombang maksimal 235 nm, hal ini menunjukkan bahwa struktur isolat A tidak banyak memiliki gugus kromofor atau ikatan rangkap terkonjugasi. Kemungkinan hanya



Gambar 2. Spektra UV isolat A dengan pelarut metanol.



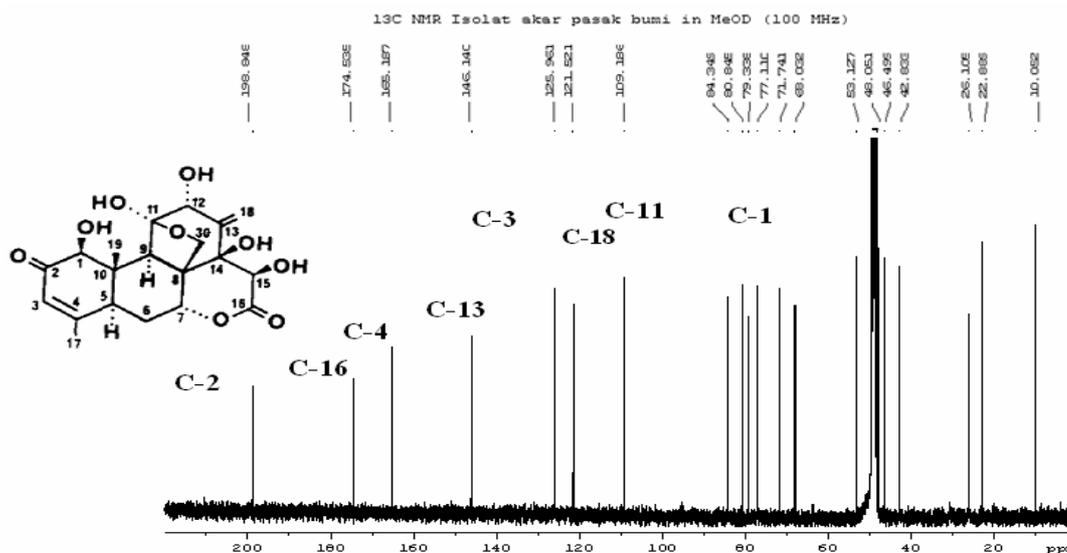
Gambar 3. Spektra IR isolat A

terdapat 1 ikatan rangkap terkonjugasi yang berupa ikatan *carbonyl unsaturated* (=C-C=O).

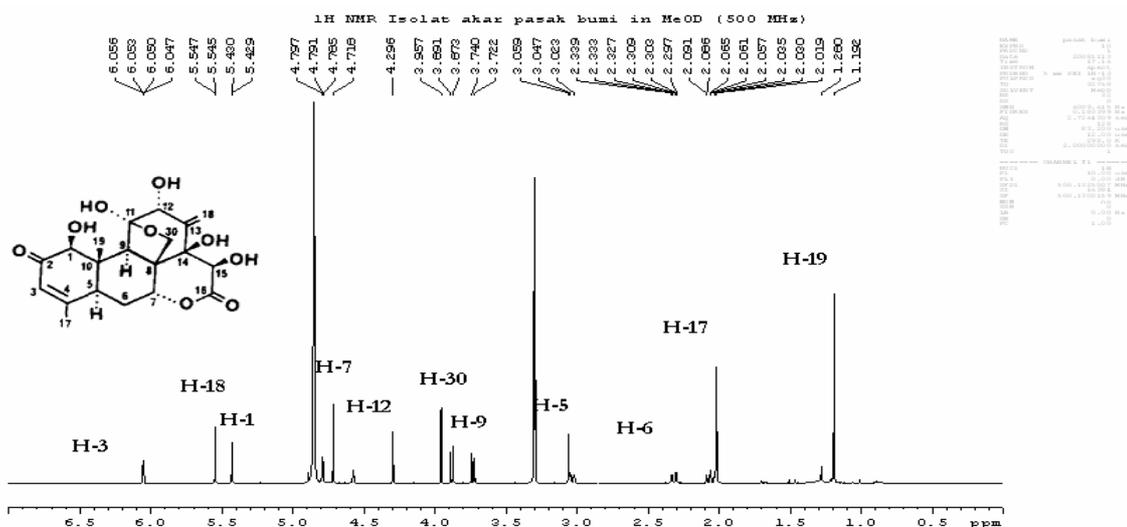
Pembacaan Spektra IR dari isolat A menggunakan FTIR Thermo Nicolet Avator 360 pada bilangan gelombang 400-4000 cm⁻¹. Hasil spektra IR isolat A (Gambar 3) menunjukkan bahwa strukturnya

Spektra ¹³C NMR dari isolat A (Gambar 4) muncul 20 peak, dimana letak peaknya bila 300 dibandingkan dengan referensi sama dengan spektra ¹³C NMR *eurycomanone* hasil identifikasi Kardono *et al.* (1991).

Pembacaan spektra ¹H NMR (Gambar 5) menggunakan Spectro ¹H NMR Bruker



Gambar 4. Spektra ¹³C NMR isolat A dengan pelarut MeOD (100 MHz).



Gambar 5. Spektra ¹H NMR isolat A dengan pelarut MeOD (500 MHz).

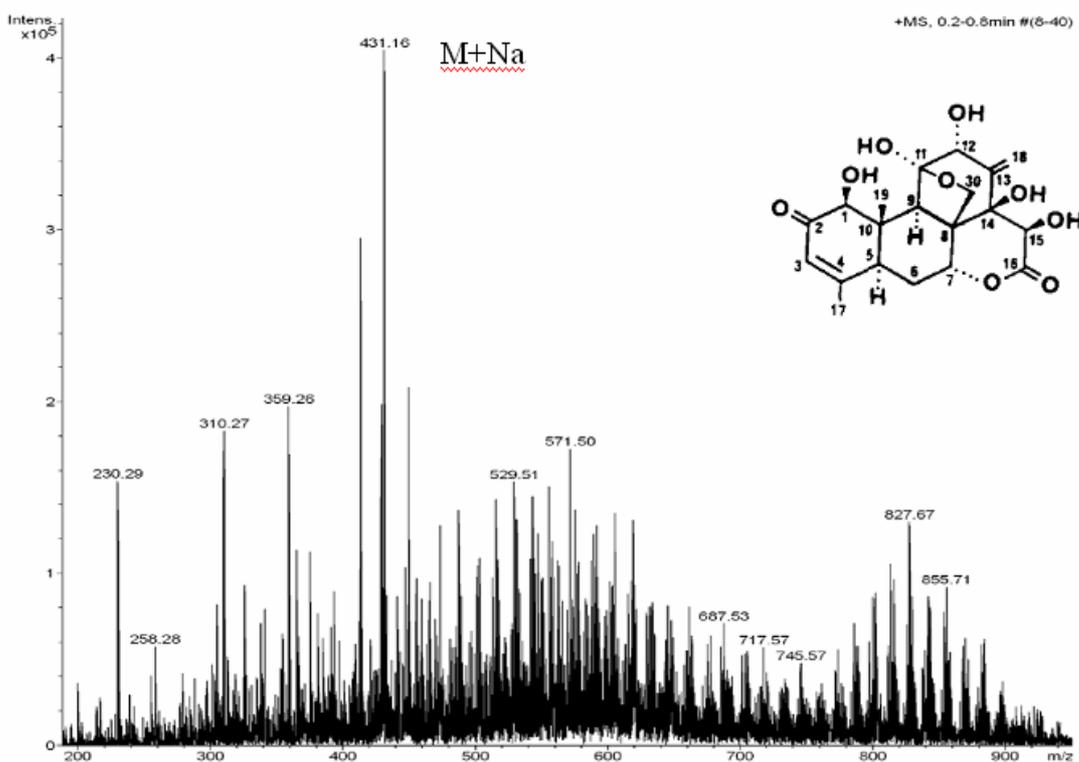
mengandung gugus fungsional.

Avance 500 MHz with 5 mm SEI probe.

Spektra ^1H NMR isolat A (Gambar 5) muncul 12 peak yang menunjukkan ada 12 lingkungan atom H yang menempel pada atom C dan tidak ada yang simetris. Sedangkan atom H yang menempel pada O, misalnya OH tidak muncul pada peak ^1H NMR. Pada spektra ^1H NMR terdapat 2 peak dengan intensitas yang sangat tinggi yaitu pada δ 3,3 ppm dan δ 4,8 ppm merupakan peak dari pelarut MeOD, sehingga tidak perlu diinterpretasikan. Dari interpretasi ^1H NMR juga memberikan kesimpulan bahwa spektra isolat A menunjukkan kemiripan dengan hasil identifikasi *eurycomanone* dari Kardono *et al.* (1991).

senyawa hasil isolasi dari bahan alam yang pasti ada impurities atau pengotornya. Spektra massa dengan metode ESI dari isolat A (Gambar 8) dideteksi low resolution, sehingga bobot molekul senyawanya ditunjukkan pada peak yang intensitasnya paling tinggi. Bobot molekul dari spektra di atas ditunjukkan pada m/z 431 ($M+\text{Na}$) sehingga BM senyawa isolat A adalah 408 ($431 - \text{BA Na}$) dan 408 juga merupakan BM dari *eurycomanone*. Dari hasil ini bisa disimpulkan bahwa isolat A merupakan senyawa *eurycomanone* (Gambar 7).

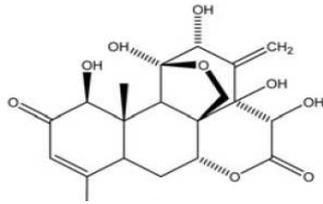
Hasil uji anti angiogenesis *eurycomanone* menunjukkan semakin tinggi



Gambar 6. Spektra Massa dari isolat A dengan metode ESI (Electrospray Ionization).

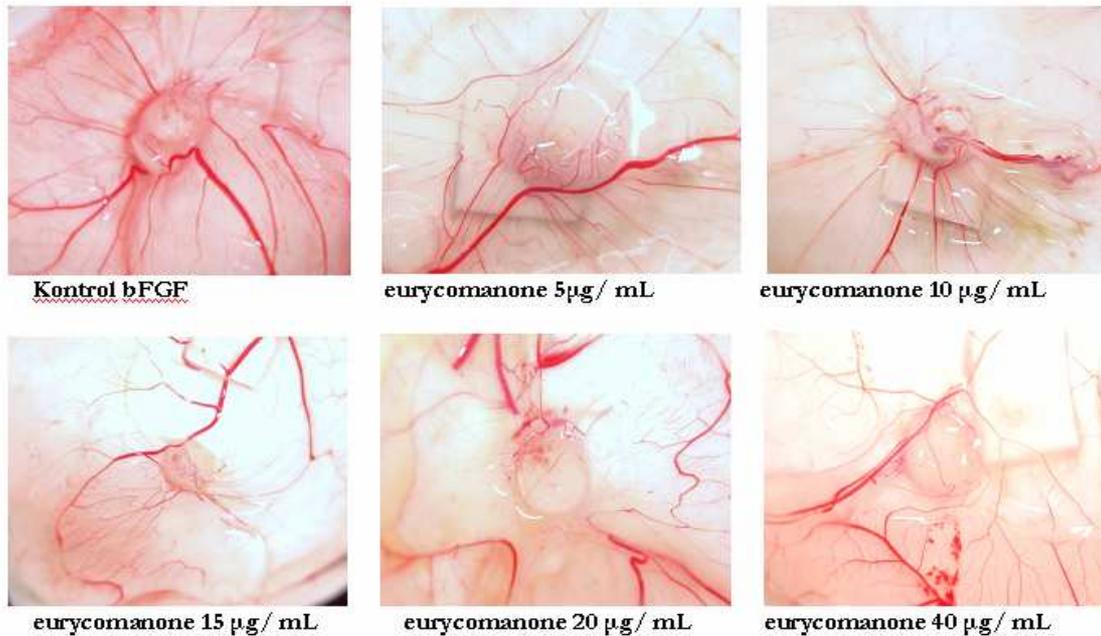
Spektroskopi massa dengan metode ESI (Mass Spectro Bruker Esquire HCT *with a standart ESI source*) adalah sangat sensitif, sehingga pengotor sekecil apapun pasti terdeteksi, apalagi isolat A merupakan

kadar, semakin tinggi pula penghambatan angiogenesis yang terjadi pada CAM terinduksi bFGF ditandai dengan terjadinya penurunan skor kerapatan pembuluh darah baru, dengan data hasil tersaji pada Tabel I.



Tabel 7. Hasil pengamatan angiogenesis kelompok kontrol dan kelompok perlakuan senyawa uji eurycomanone

Kelompok Perlakuan	Jumlah Telur	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
bFGF + eurycomanone kadar 5 µg/mL	4	+3
bFGF + eurycomanone kadar 10 µg/mL	4	+2
bFGF + eurycomanone kadar 15 µg/mL	4	+2
bFGF + eurycomanone kadar 20 µg/mL	4	+1
bFGF + eurycomanone kadar 40 µg/mL	4	+1



Gambar 8. Pengamatan makroskopik CAM terinduksi bFGF pada perlakuan senyawa uji

Gambaran makroskopik kelompok kontrol bFGF dan kelompok uji eurycomanone tersaji pada Gambar 8, dimana penghambatan angiogenesis mulai terjadi pada kadar 10 µg/mL. Gambaran makroskopik angiogenesis pada CAM adalah menghitung jumlah pembuluh darah baru yang timbul kemudian diskoring, hal ini merupakan modifikasi dari metode yang dikembangkan Knighton *et al.* (1977). Modifikasi dilakukan karena pada saat perhitungan jumlah pembuluh baru yang ada pada *paper disc* dan

daerah di sekelilingnya oleh 3 pengamat ternyata hasilnya ada pengaruh subyektifitas dari pengamat ketika menentukan mana pembuluh darah yang ikut dihitung maupun yang tidak. Sedang pada metode Knighton *et al.* (1977) dengan skoring, pada Gambaran makroskopis angiogenesis pada CAM diberikan skor 0, +1 dan +2. Skor 0 bila tidak ditemukan adanya respon angiogenesis berupa kerapatan pertumbuhan pembuluh darah baru ke arah jaringan implan. Skor +1 diberikan apabila terdapat respon angiogenesis

berupa pertumbuhan beberapa pembuluh darah baru, dan skor +2 bila terdapat respon angiogenesis yang besar berupa pertumbuhan pembuluh darah yang banyak yang menuju jaringan implant. Modifikasi metode ini adalah tetap dihitung jumlah pembuluh darah baru yang muncul oleh 3 orang kemudian hasilnya diskoring.

Berdasarkan penelitian ini, diketahui bahwa *eurycomanone* 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, mengarahkan pada penghambatan.

Penelitian mengenai efek eurykumanon dalam menginduksi apoptosis terhadap kultur sel HeLa dilakukan Nurkhasanah and Pihie. (2004) 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 senyawa dalam studi ini mempunyai kemampuan untuk menghambat metastasis melalui pembuluh limfa.

Kesimpulan

Struktur kimia isolat A dari akar pasak bumi, diidentifikasi sebagai *eurycomanone*. *Eurycomanone* mampu menghambat angiogenesis pada CAM embrio ayam terinduksi bFGF mulai kadar 10 µg/mL.

Daftar pustaka

- Chan K.L. , Chee-Yan Choo, Noor Rain Abdullah, and Zakiah Ismail, 2004, Antiplasmodial studies of *Eurycoma longifolia* Jack using the lactate dehydrogenase assay of *Plasmodium falciparum*, *Journal of Ethnopharmacology* 92, 223-227
- Hanahan, D and Weinberg, R.A., 2000, The Hallmark of Cancer, *Cell*, 100:57-68.
- Jenie R.I., Meiyanto, dan 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
- Jing, R.W., Mao-de L., and Jian-guang Z., 2006, Anticancer effects of Chinese herbal medicine, science or myth?, *J.Zhejiang Univ SCIENCE B*. 7(12): 1006-1014
- Kardono, L.B.S., Angerhofer, C.K., Tsauri, S., Padmawinata, K., Pezzuto, and J.M., Kinghorn, D., 1991., Cytotoxic and antimalarial constituents of the roots of *Eurycoma longifolia*, *Journal of Natural Products* 54, 1360-1367

- 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
- 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*, Kuala Lumpur
- O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R.A., Moses, M., Lane, W.S., Cao, Y., Sage, E.H., and Folkman, J., 1994, Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma, *Cell*, 79: 315-328.

- Ribatti, D., Gulandaris, A., Bastaki, M., Vacca, A., Lurlalo, M., Roncali, L., and 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.
- 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., and 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., and 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 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/10/2524.asp>

* Koresponden : Prof. Dr. Sugiyanto, SU., Apt.
Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada
E-mail: dahlansugiyanto@yahoo.com

