

**SITOTOKSISITAS SENYAWA HASIL ISOLASI DAUN  
*TITHONIA DIVERSIFOLIA* (HEMSLEY) A. GRAY)  
TERHADAP SEL T47D, MCF7 DAN EVSA-T**

**SITOTOXICITY OF COMPOUND ISOLATED FROM THE LEAVES OF  
*TITHONIA DIVERSIFOLIA* (HEMSLEY) A.GRAY) AGAINST T47D, MCF-7  
AND EVSA-T CELLS**

Arfian Bela Mahardika<sup>1)</sup> Subagus Wahyuono<sup>2)</sup> Mae Sri Hartati Wahyuningsih<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Alumni Mahasiswa Fakultas Farmasi, UGM <sup>2)</sup>Fakultas Farmasi, UGM

<sup>3)</sup>Fakultas Kedokteran, UGM

---

**ABSTRAK**

Tanaman kembang bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray) merupakan salah satu tanaman yang secara tradisional digunakan masyarakat untuk mengobati berbagai penyakit. Penelitian awal menggunakan metode *Bioassay Guided Isolation* telah diperoleh senyawa aktif (MTT sel HeLa; IC<sub>50</sub> 9,776 µg/mL). Efek sitotoksik senyawa aktif terhadap sel kanker payudara belum diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sitotoksitas senyawa aktif hasil isolasi daun *T. diversifolia* terhadap sel kanker payudara T47D, MCF-7 dan EVSA-T dengan menghitung nilai IC<sub>50</sub>-nya. Senyawa hasil isolasi daun *T. diversifolia* diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel kanker payudara T47D, MCF-7 dan EVSA-T menggunakan metode MTT dengan seri kadar 0,39-50 µg/mL. Setiap kelompok kadar dilakukan triplikasi dan dihitung persentase penghambatan pertumbuhan sel T47D, MCF-7 dan EVSA-T dengan analisis probit untuk menghitung IC<sub>50</sub>-nya. Hasil uji menunjukkan bahwa isolat aktif memiliki efek sitotoksik terhadap sel T47D, MCF-7 dan EVSA-T dengan nilai IC<sub>50</sub> berturut-turut adalah (2,44; 4,697; 3,522) µg/mL, sehingga potensial dikembangkan sebagai agen antikanker khususnya kanker payudara.

**Kata Kunci:** *Tithonia diversifolia*, sitotoksitas, sel kanker payudara, MTT

### ABSTRACT

*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray) is one of the plants that are traditionally used to treat various diseases. The previous studies using Bioassay Guided Isolation methods has obtained the active compound (MTT, HeLa cells; IC<sub>50</sub> 9.776 µg / mL). The cytotoxic effects of active compounds against breast cancer cells is unknown. This study aims to determine the cytotoxicity of the active compound isolated from the leaves of *T. diversifolia* on breast cancer cells (T47D; MCF-7 and EVSA-T). The isolated compounds from *T. diversifolia* tested their cytotoxicity against breast cancer cells (T47D, MCF-7 and EVSA-T), using MTT method with a series of concentration of 0.39 to 50 ug/mL. Each concentration of the group performed triplicate and calculated the percentage of cell growth inhibition with probit analysis to calculate the IC<sub>50</sub> value. The test results showed that the active compound have a cytotoxic effect on T47D, MCF-7 and EVSA-T cells with IC<sub>50</sub> values are respectively (2.44; 4.697; 3.522) ug/mL, so this compound potential to be developed as an anticancer agent, especially breastcancer.

**Keywords:** *Tithonia diversifolia*, cytotoxicity, breast cancer cells, MTT

---

## PENDAHULUAN

Kanker payudara berada pada urutan ke-2 dari sejumlah kanker yang diderita wanita Amerika Serikat, Indonesia, dan negara lain pada umumnya (Medina & Kittrell 2003). Di RSUP DR. Sardjito Yogyakarta, setiap tahun ada 250 hingga 300 kasus baru kanker payudara dan kecenderungan penderita penyakit kanker payudara dialami perempuan dalam usia relatif lebih muda: antara 30 sampai 45 tahun (Anonin, 2012 )

Obat antikanker atau sitostatika adalah obat yang dapat menghentikan pertumbuhan sel-sel kanker. Agar supaya terapi keganasan ini dapat berhasil dengan baik, maka prinsip kerja obat antikanker harus dapat membasmi sel kanker secara total. Mekanisme kerja obat antikanker ini didasarkan atas terjadinya gangguan pada salah satu proses sel yang esensial (Nafrialdi and Gan, 1995). Oleh karena itu sangat diperlukan adanya penemuan obat baru yang mempunyai efek sitotoksik yang baik pada sel kanker. Pencarian obat kanker sekarang semakin menarik dengan semakin tingginya gerakan kembali ke alam, yaitu dengan pemanfaatan fitofarmaka, menggali kandungan unsur kimiawi dalam tumbuh-tumbuhan yang potensial dapat dipakai sebagai obat (Ganiswara & Nafrialdi, 1995).

Salah satu tanaman yang banyak diteliti manfaatnya sebagai antikanker adalah tanaman kembang bulan [*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray]. Goffin ( 2002) melaporkan bahwa ekstrak eter kembang bulan mempunyai efek sitotoksik pada sel HTC-116.

Dilaporkan juga bahwa ekstrak ethyl aasetat dari tanaman *T. diversifolia* dapat menghambat proliferasi sel kanker kolon (Col-2), sedangkan ekstrak alkohol menunjukkan aktivitas sebagai antileukemia (Gu *et al.*, 2002; Nabin *et al.*, 1979). Ekstrak terpurifikasi dari ekstrak kloroform *T. diversifolia* memiliki efek sitotoksik terhadap sel HeLa dengan nilai  $IC_{50}=3,078\mu\text{g/ml}$  dan Indeks Selektivitas sebesar 26.09 (Wahyuningsih *et al.*, 2013). Senyawa aktif telah berhasil diisolasi dari ekstrak kloroform daun Kembang Bulan menggunakan metode *Bioassay Guided Isolation* (MTT pada sel Hela,  $IC_{50}=9,776\mu\text{g/ml}$ ) (Wahyuningsih *et al.*, 2008).

Sel T47D, MCF-7 dan EVSA-T merupakan contoh dari sel kanker payudara. Sel T47D adalah sel kanker payudara manusia yang bersifat *ER/progesterone receptor-positif* dan berasal dari cairan pleural. Sel ini mengekspresikan suatu mutan dari protein p53 dan sel ini sangat sensitif terhadap efek stimulan dari estradiol (Schafer *et al.*, 2000). Sel MCF-7 merupakan sel kanker payudara yang diambil dari jaringan payudara seorang wanita Kaukasian berumur 69 tahun golongan darah O, dengan Rh positif, berupa sel adherent (melekat) yang dapat ditumbuhkan dalam media penumbuh DMEM atau RPMI yang mengandung foetal bovine serum (FBS) 10% dan antibiotik Penicilin-Streptomycin 1% (Anonim, 2007). Sel MCF-7 memiliki karakteristik antara lain resisten agen kemoterapi (Mechetner *et al.*, 1998; Aouali *et al.*, 2003), mengekspresikan reseptor

estrogen (ER +), overekspresi Bcl-2 (Butt *et al.*, 2000; Amundson *et al.*, 2000) dan tidak mengekspresikan caspase-3 (Onuki *et al.*, 2003; Prunet *et al.*, 2005). Sel EVSA-T merupakan sel kanker payudara yang diambil dari asites efusi ganas dari seorang wanita dengan karsinoma payudara metastatik; mengekspresikan estrogen reseptor-negatif dan progesteron reseptor-positif (ER -). Sel EVSA-T mempunyai *viabilitas* rendah (sekitar 50%) untuk minggu pertama penumbuhan (Anonim, 2016).

Uji sitotoksik adalah perkembangan metode untuk memprediksi keberadaan obat sitotoksik baru termasuk diantaranya dari bahan alam yang berpotensi sebagai antikanker. Berdasarkan sifat-sifat toksik senyawa tersebut maka sifat sitotoksik merupakan syarat mutlak dari obat antikanker (Burger, 1970). Penelitian efek sitotoksik isolat dari *T. diversifolia* terhadap ketiga sel kanker payudara tersebut belum pernah dilakukan. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengkaji sitotoksisitas senyawa aktif hasil isolasi *T. diversifolia* terhadap sel kanker payudara (T47D, MCF7 dan EVSA-T) secara *in vitro*.

## METODOLOGI

Penelitian ini bersifat eksperimentatif-eksploratif *in vitro* untuk mendapatkan data sitotoksisitas senyawa aktif hasil isolasi daun *T. diversifolia* terhadap sel kanker payudara T47D, MCF7 dan EVSA-T.

### Bahan

Sel line kanker payudara (T47D, MCF7 dan EVSA-T) diperoleh dari Prof. Kees Nooter (Erasmus Medical Center, the Netherlands) dan ditumbuhkan di LPPT UGM. Media DMEM (Sigma), natrium bikarbonat (Sigma), dan Hepes (Sigma). Media kultur sel terdiri dari media DMEM (Sigma), Fetal Bovine Serum (Sigma) 10 % (v/v) (Gibco), Penisilin-Streptomisin 1 % (v/v) (Gibco) dan fungison 0,5 % (v/v) (Gibco). Selain itu juga digunakan trypsin 0,5 %, larutan PBS, etanol 70 % dan MTT 5 mg/ml (Sigma). Semua bahan yang digunakan berkualitas pro analisis (p.a.) produksi Merck kecuali disebutkan khusus.

### Alat

Alat-alat gelas yang lazim dipakai di laboratorium, tabung konikal steril, sentrifuge Sigma 3K12 (B. Braun Biotech International), *Microplate* 96 well (Nunclone), CO2 Jacketed Incubator (Nuaire™ IR autoflow), tabung conical steril (nunclone), scarper, *tissue culture flask* (nunclone), Laminar airflow (Nuaire), haemocytometer (New Bauer), mikropipet 200 µl – 1 ml, 2 – 20 µl, 5 – 40 µl, 20 – 200 µl, yellow tape dan blue tape steril, almari es 4°C dan -20°C, mesin vortex.

## CARA PENELITIAN

### Preparasi seri konsentrasi dari isolate aktif

Isolat aktif hasil isolasi *T. diversifolia* ditimbang 1,0 mg dan dilarutkan dalam *Dimethyl sulphoxide* (DMSO) sebanyak 100 µl, dibantu dengan alat fortek, sehingga diperoleh larutan dengan

konsentrasi 10.000 µg/mL. Selanjutnya diencerkan dengan medium DMEM menjadi beberapa konsentrasi dari 0,39 s/d 50 µg/mL.

#### **Uji Sitotoksik dengan metode MTT (Moosman, 1983)**

Menggunakan *microplate* 96 sumuran. Setiap sumuran diisi dengan 100 µl medium DMEM, FBS 0,5% yang mengandung sel T47D, MCF-7 dan EVSA-T dengan kepadatan  $2 \times 10^3$  sel/well, selanjutnya diinkubasikan selama 24 jam. Keesokan harinya media dibuang dan diganti dengan seri konsentrasi sampel (0,39 s/d 50) µg/mL dalam media DMEM dan FBS 10%. Setiap konsentrasi dibuat triplikat. Kultur sel tersebut diinkubasi selama 24 jam pada 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Setelah 24 jam ditambahkan larutan MTT (5mg/ml PBS) (10 µl/sumuran). Kultur sel diinkubasi selama 4 jam pada 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Stop solution (100 µl/sumuran) ditambahkan pada sel

#### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Parameter sitotoksik yang digunakan adalah kemampuan konversi substrat 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-dipheniltetrazolium bromid (MTT) menjadi formazan ungu oleh enzim suksinat dehidrogenase pada sel hidup. Pengujian efek sitotoksik dilakukan dengan triplikat, yakni masing-masing konsentrasi diujikan pada tiga sumuran untuk menghindari bias dalam penelitian

diinkubasi selama semalam pada 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, kemudian *optical density* diukur pada λ 540 nm dengan ELISA *plate reader*.

#### **Persentase penghambatan sel**

Persentase penghambatan sel dari tiap-tiap konsentrasi sampel yang diperoleh dihitung dan dianalisis menggunakan rumus:

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{(A-B) - (C-B)}{(A-B)} \times 100\%$$

Keterangan:

A = rata-rata absorbansi media sel

B = rata-rata absorbansi media

C = rata-rata absorbansi sampel uji

#### **Analisis Hasil**

Efek sitotoksik isolat aktif hasil isolasi *T. diversifolia* terhadap sel T47D, MCF7 dan EVSA-T dianalisis dengan menghitung persentase penghambatan sel seperti rumus di atas, selanjutnya nilai IC<sub>50</sub> diperoleh dengan analisis regresi probit dari *SPSS 15 For Windows*.

ini. Sifat sitotoksik merupakan langkah utama dalam usaha penemuan obat antikanker baru dari bahan alam (Nooter, 1997; Nooter *et al.*, 1999). Penelitian antikanker yang bertitik berat pada bagaimana mekanisme sel kanker terbunuh oleh obat-obat sitotoksik, merupakan ilmu yang baru berkembang saat ini.

Data persentase penghambatan masing masing konsentrasi isolat aktif hasil isolasi dari *T. diversifolia* seperti terlihat pada tabel I.

**Tabel I. Rerata persentase penghambatan isolat aktif terhadap sel T47D, MCF7 dan EVSA-T**

Kadar ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rerata persentase penghambatan (%)		
	T47D	MCF7	EVSA-T
50	90,17	84,83	94,18
25	84,72	80,06	92,61
12,5	82,97	89,33	95,59
6,25	65,07	79,21	84,43
3,125	53,49	33,43	24,37
1,562	47,16	25,56	31,45
0,78	22,49	5,62	8,33
0,39	22,27	0	2,99
<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>2,44</b>	<b>4,697</b>	<b>3,522</b>

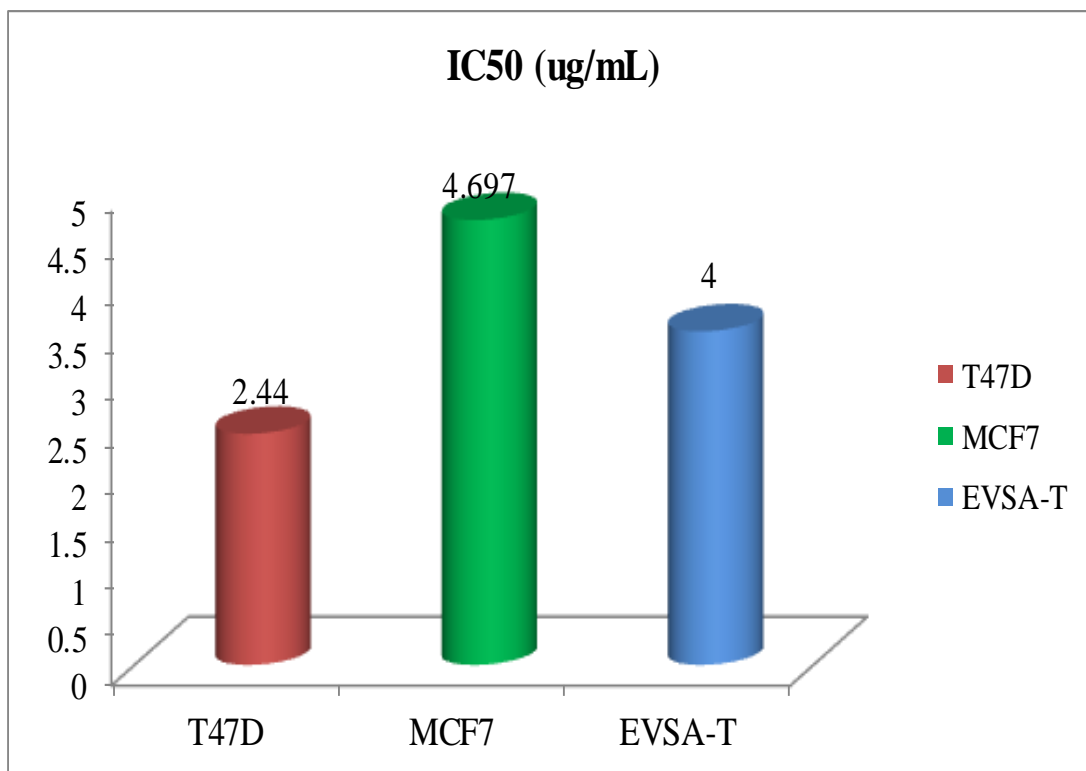
**Sumber:** primer untuk data sel T47D (Mahardika, 2010)

Absorbansi hasil pembacaan ELISA *reader* kemudian dihitung persentase penghambatannya. Hasil penghitungan rerata persentase penghambatan dapat dilihat pada Tabel 1. Secara umum, terlihat adanya peningkatan persentase penghambatan sel seiring dengan bertambahnya konsentrasi isolat yang diberikan, hal ini dinamakan dengan fenomena *dose dependent*.

Untuk mengetahui efek sitotoksik dari isolat perlu dilakukan penghitungan IC<sub>50</sub> dari persentase penghambatan tersebut. Nilai IC<sub>50</sub> merupakan besarnya konsentrasi suatu senyawa yang menimbulkan penghambatan kehidupan dari 50%

sel atau hewan yang diuji (Sieuwerts *et al.*, 1995). Nilai IC<sub>50</sub> tersebut dapat dihitung dengan analisa probit menggunakan program *SPSS 16.0 for Windows*. Data IC<sub>50</sub> tiap sel yang diperoleh dari analisa probit disajikan dalam gambar 1. Dari tabel 1 terlihat bahwa nilai IC<sub>50</sub> isolat aktif hasil isolasi *T. diversifolia* pada sel T47D, MCF7 dan EVSA-T berturut-turut adalah (2,44; 4,697; 3,522)  $\mu\text{g/mL}$ .

Untuk memperjelas nilai IC<sub>50</sub> dari isolat aktif hasil isolasi daun *T. diversifolia* pada sel T47D, MCF7 dan EVSA-T dapat dilihat dari Gambar 1.



Gambar 1. Grafik Nilai IC<sub>50</sub> isolat aktif hasil isolasi *T. diversifolia* terhadap sel T47D, MCF7 dan EVSA-T

Kuantifikasi konsentrasi toksik pada penelitian ini menggunakan kriteria *National Cancer Institute* (NCI). Menurut kriteria *National Cancer Institute* (NCI), suatu senyawa dikatakan memiliki efek sitotoksik yang poten bila mempunyai nilai IC<sub>50</sub> lebih kecil dari 30 µg/ml (Suffness & Pezzuto, 1990) atau kurang dari 20 µg/ml (Benzivin, 2003). Semakin kecil nilai IC<sub>50</sub>, semakin poten senyawa tersebut dalam menghambat pertumbuhan sel. Berdasarkan kriteria tersebut, isolate aktif yang diisolasi dari daun kembang bulan (*T. diversifolia* (Hemsley) A. Gray) memiliki efek sitotoksik < 20 µg/mL, terhadap ketiga sel kanker payudara tersebut artinya senyawa tersebut sangat potensial dikembangkan sebagai agen antikanker khususnya untuk

kanker payudara. Selain itu, perlu juga dilakukan pengujian terhadap sel normal untuk menilai selektivitas isolat dalam membasmi sel kanker payudara.

Penelitian lanjut oleh Mardihusodo *et al.* (2013) tentang mekanisme kerja senyawa aktif hasil isolasi daun *T. diversifolia* disimpulkan bahwa senyawa aktif tersebut dapat menghambat siklus sel WiDr serta ekspresi VEGF sel WiDr. Senyawa aktif hasil isolasi dari *T. diversifolia* teridentifikasi sebagai Tagitinin C berdasarkan data spektroskopi dan dibandingkan dengan data literatur. Tagitinin C paling aktif dan selektif pada sel kanker kolon (WiDR, IC<sub>50</sub> = 0,585±0.08 ug/ml) (Wahyuningsih *et al.*, 2015).

## KESIMPULAN

Senyawa aktif hasil isolasi daun kembang bulan (*T. diversifolia* (Hemsley) A. Gray) memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D, MCF7 dan EVSA-T berturut-turut mempunyai nilai IC<sub>50</sub> (2,44; 4,697; 3,522) ug/mL. Dapat dikatakan bahwa isolat aktif tersebut sangat potensial dikembangkan sebagai agen antikanker payudara.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amundson, S.A., Myers, T.G., Scudiero, D., Kitada, S., Reed, J.C., and Fornace, A.J., 2000, An Informatics Approach Identifying Markers of Chemosensitivity in Human Cancer Cell Lines, *Cancer Res*, 60:6010-6110
- Anonim, 2007, ATCC Cell Biology, available from [http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atcc\\_Num=HTB-22](http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atcc_Num=HTB-22), cited in 25 June 2007.
- Anonim, 2012, from <http://winners4lifeindonesia.com/transfer-factor-untuk-penyakit-kanker-payudara.pdf>. Akses Juni 2016.
- Anonim 2016, from (<https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-433.html>). Akses Juli 2016
- Aouali, N., Morjani, H., Trussardi, A., Soma, E., Giroux, B., and Manfait, M., 2003, Enhanced Cytotoxicity and Nuclear Accumulation of Doxorubicin-loaded Nanospheres in Human Breast Cancer MCF-7 Cells Expressing MRP1, *International Journal of Oncology*, 23:1195-1201.
- Benzivin, C. Devehat. Tomasi, S. Boustie, J., 2003. Cytotoxic Activities of some Lichen Extracts on Murine and Human Cancer Cell Lines. *Phytomedicine* 10:499-503.
- Burger, A., 1970, *Medicinal Chemistry*, 3<sup>th</sup> ed., p. 681 - 694, Wiley Interscience Publication, New York.
- Butt, A.J., Firth, S.M., King, M.A., and Baxter, R.C., 2000, Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3 Modulates Expression of Bax and Bcl-2 and Potentiates P53-Independent Radiation-Induced Apoptosis In Human Breast Cancer Cells, *J. Biol Chem*, 275 (50) : 39174 - 39181.
- Freshney, I.R. 2000. *Culture of Animal Cells Manual of Basic Technique*. New York : A John Wiley and Sons Ltd.
- Goffin, E., Ziemons, E., De Mol, P., de Madureira Mdo, C., Martins, AP., da Cunha, AP., Philippe, G., Tits, M., Angenot, L., and Frederich, M., 2002, In vitro antiplasmodial activity of *Tithonia diversifolia* and identification of its main active constituent: Tagitinin C, *Planta Medica*, 68(6);543-545.
- Gu, J. Q., Gills, JJ., Park, EJ., Mata-Greenwood, E., Hawthorne, ME., Axelrod, F., Chavez, PI., Fong, HH., Mehta, RG., Pezzuto, JM. and Kinghorn, AD., 2002, Sesquiterpenoids from *Tithonia diversifolia*



- with potencial care chemopreventive activity, *J Nat Prod*, 65(4),532-536.
- Mahardika, A.B., 2010, Efek Sitotoksik Senyawa Hasil Isolasi Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray) terhadap Sel Kanker Payudara T47D [Skripsi], Fakultas Farmasi, UGM
- Mardihusodo, HR., Wahyuningsih, MSH., Astuti I., 2013, The effect of active compound isolated from the leaves of Kembang bulan (*T. diversifolia* (Hemsley) A. Gray) on cell cycle and angiogenesis of WiDR cell line, *Journal of the Medical Sciences*, 45 (3), 101-111.
- Medina, D., Kittrell, F. S., 2003. p35 function is required for hormone – mediated protein of mouse mamary tumorigenesis. *Canc Res*. 63: 6140-6143.
- Menchetner, E., Kyshtoobayeva, A., Zonis, S., Kim, H., Stroup, R., Garcia, R., Parker, R.J., and Fruehauf, J.P., 1998, Levels of Multidrug Resistance (MDR1) P-Glycoprotein Expression by Human Breast Cancer Correlate with in Vitro Resistance to Taxol and Doxorubicin, *Clinical Cancer Research*, 4:389-398.
- Mosman,T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 65,55-63.
- Nabin, C., Baruah., Ram P, Sharma., Madhusudanan, K.P., and Gopalakrishna, T., 1979, Sesquiterpene lactone of *Tithonia diversifolia*. Stereochemistry of the Tagitinins and related compounds, *J. Org.Chem*, 44(11);1831.
- Nafrialdi dan Gan, S., 1995, Dalam farmakologi dan Terapi, Edisi IV, Ganiswara, S.G., Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran UI, Jakarta, 48, 702
- Nooter K, 1997, the Role Of P<sub>53</sub> In Resistance To Cytotoxic Therapy Of Human Cancer. *South West Cancer News*. 4, 12-13
- Nooter K, Burger H, Schenk P, Stoter G, 1999, Molecular mechanisms of drug resistance and sensitivity. *Oncological Research at the Erasmus University Rotterdam-University Hospital Rotterdam*, 39-40
- Onuki, R., Kawasaki, H., Baba, T., dan Taira, K., 2003, Analysis of A Mitochondrial Apoptotic Pathway Using Bid-Targeted Ribozymes in Human MCF7 Cells in the Absence of A Caspase-3-Dependent Pathway, *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, 13 (2): 75-82.
- Prunet, C., Lemaire-Ewing, S., Ménétrier, F., Néel, D., dan Lizard, G., 2005, Activation of Caspase-3-Dependent and -Independent Pathways During 7-Ketocholesterol- and 7 $\beta$ -Hydroxycholesterol-Induced Cell Death: A

- Morphological and Biochemical Study, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 19 (5): 311-326.
- Sieuwert, A. M., Klijn, J. G. M., Peters, H. A., and Foekens, J. A., 1995, The MTT Tetrazolium salt assay scrutinized: How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC<sub>50</sub>-values and cell survival, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 33, 813-823.
- Suffness, M., dan Pezzuto, J.M., 1990, Assay Related to Cancer Drug Discovery. In: K. Hostettmann (Ed.): *Methods in Plant Biochemistry*. Vol.6. Assays for Bioactivity. Academic Press. London. pp: 71-133.
- Wahyuningsih MSH., Syarif RA., Rakhmawati R., 2008. Isolasi Senyawa Berpotensi Antikanker dari Fraksi Aktif *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray dan Penelusuran Mekanisme Apoptosisnya [Laporan Penelitian Dana Masyarakat], Fakultas Kedokteran UGM
- Wahyuningsih MSH., Syarif RA., Suharmi S., Murini T., Saputra F., Adiguno Suryo W., 2013, Selectivity of Purified Extract from the leaves of *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A.Gray) against Hela Cells, *Trad. Med. J.*, 18(1), 22-28
- Wahyuningsih, MSH., Wijayanti MA., Budiyo A., Muhammad Hanafi, 2015, Isolation and Identification of Potential Cytotoxic Compound from Kembang bulan [*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray] Leaves, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 7 (6), 298-301.