

NASKAH PUBLIKASI

ANALISIS UJI *IN VIVO* FRAKSI KLOOROFORM HERBA BANDOTAN (*Ageratum conyzoides L.*) SEBAGAI AGEN KEMOPREVENTIF KANKER PAYUDARA

IN VIVO TEST ANALYSIS OF CHLOROFORM FRACTION BANDOTAN HERBS (*Ageratum conyzoides L.*) AS BREAST CANCER CHEMOPREVENTIVE AGENTS

Aulia Rahma¹, Heni Ratnasari², Rifki Febriansah³

^{1,2}Undergraduated, Pharmacy, Medical Faculty and Health Science,
Muhammadiyah University of Yogyakarta

³Lecturer, Pharmacy, Medical Faculty and Health Science, Muhammadiyah
University of Yogyakarta

Brawijaya Street, Tamantirto, Kasihan, Bantul, Yogyakarta, 55183

¹Corresponding author : auliarahma217@gmail.com

ABSTRAK

Kemoterapi banyak menimbulkan efek samping akibat tidak selektifnya sasaran terapi pada sel kanker payudara. Maka perlu adanya solusi terapi berupa agen kemopreventif berbahan dasar alam yang minim efek samping pada penggunaan yang tepat. Herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) diduga berpotensi sebagai agen kemopreventif. Fraksi kloroform herba bandotan (FKB) mengandung senyawa flavonoid yang berpotensi pada proses apoptosis sel kanker HeLa (kanker serviks) serta nobiletin yang merupakan salah satu senyawa flavonoid memiliki ikatan kuat terhadap protein Bcl-xl. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi dari senyawa flavonoid pada FKB dalam berikatan dan menghambat protein VEGF sebagai agen kemopreventif kanker payudara.

Metode penelitian dilakukan secara *in silico* dan *in vivo*. Sebagai uji pendahuluan dilakukan menggunakan *molecular docking* senyawa nobiletin terhadap protein sel kanker payudara (COX-2, HER-2, dan VEGF). Penyarian senyawa dilakukan secara maserasi dan fraksinasi. Identifikasi senyawa flavonoid pada FKB menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Sebanyak 20 ekor tikus betina galur SD (40 hari, 40-60 gram) dikelompokkan menjadi K.DMBA, K.FKB, K.CMCNa, DMBA+FKB750, dan DMBA+FKB1500. Induksi DMBA dosis 20 mg/kg BB sebanyak 2 kali seminggu selama 5 minggu, sedangkan FKB diberikan setiap hari selama 2 minggu. Setelah nekropsi kelenjar payudara, dilakukan pengecatan Hematoksillin-Eosin serta Imunohistokimia dengan antibodi VEGF. Analisis yang dilakukan melalui nilai Rf pada KLT, skor *docking* pada *molecular docking*, serta histologi dan ekspresi VEGF pada histopatologi kelenjar payudara.

Hasil menunjukkan bahwa FKB mengandung senyawa flavonoid. Secara *in silico* diperoleh hasil interaksi terbaik antara nobiletin dan VEGF dengan skor

docking -7.6 kcal/mol. Sedangkan berdasarkan uji *in vivo*, FKB menurunkan kerusakan histologi kelenjar payudara. Pemberian FKB dosis 1500 mg/kg BB imunoreaktif terhadap antibodi VEGF dengan persentase jumlah sel positif 15,51%.

Kata Kunci: *Ageratum conyzoides L.*, HE, Imunohistokimia, kanker payudara, *molecular docking*

ABSTRACT

Chemotherapy is usually done to cause many side effects due to the selectivity of therapy targets for breast cancer cells. Therefore, it needs to be a therapeutic solution in the form of a natural chemopreventive agent with minimal side effects on proper use. Bandotan herb (*Ageratum conyzoides L.*) is thought to have the potential as a chemopreventive agent. Chloroform Fraction of Bandotan Herbs (FKB) have flavonoid compounds as a good potential in HeLa cell apoptosis (cervical cancer) and also nobiletin (one of flavonoid groups) have a good binding to Bcl-x1 proteins. This research obtained to know about potentiality FKB as breast cancer chemopreventive agent to binding and inhibits VEGF protein targets.

Research methods use *in silico* and *in vivo* analysis. As a preliminary test carried out using molecular docking nobiletin compounds against breast cancer cell proteins (COX-2, HER-2, and VEGF). Active compound was carried out using maceration and fractionation methods. Identification of active compounds was carried out using Thin Layer Chromatography (TLC) method. *In vivo* test, twenty *Sprague Dawley* rats (40 days, 40-60 grams) classified K.DMBA, K.FKB, K.CMCNa, DMBA+FKB750, and also DMBA+FKB1500. Carcinogenic agents DMBA induce dose given of 20 mg/kg BW twice a week for 5 weeks. FKB was given every day for 2 weeks. After necroption of mammary glands, staining was carried out with Haematoxyllin-Eosin and Immunohistochemistry with VEGF antibodies. Analysis method based on Rf value from TLC, docking score from molecular docking, histology and expression of VEGF at mammary gland histopatology.

The results showed that FKB contained flavonoid compounds. *In silico* test, the best interaction is between nobiletin and VEGF that obtained with a docking score -7.6 kcal / mol. While based on the *in vivo* test, FKB have potentiality to decrease of mammary gland histological damages. FKB dose 1500 mg/kg BW immunoreactive with VEGF antibodi by the percentage of positive cells at 15,51%.

Keywords: *Ageratum conyzoides L.*, breast cancer, HE, Immunohistochemistry, *molecular docking*

PENDAHULUAN

Penyakit tidak menular masih menjadi permasalahan besar pada kesehatan dunia karena memiliki angka morbiditas dan mortalitas yang tinggi. Salah satunya adalah penyakit kanker yang menduduki posisi kedua kejadiannya setelah penyakit kardiovaskuler. Diantara jenis penyakit kanker, kanker serviks dan kanker payudara memiliki insidensi yang tinggi pada wanita Indonesia yaitu sejumlah 48.998 kasus (WHO, 2014). Berdasarkan data *Globocon, International Agency for Research on Cancer* pada tahun 2012 angka kejadian kasus baru kanker payudara sebesar 43,3%. Sedangkan prosentase kejadian kematiannya sebesar 12,9%.

Dewasa ini, pengobatan atau terapi kanker yang telah dilakukan adalah melalui kemoterapi, pembedahan, radiasi maupun kombinasi. Namun hingga saat ini belum ada terapi kanker khususnya kemoterapi yang menyerang sel abnormal secara spesifik, sehingga masih banyak terjadi efek samping dari penggunaannya terhadap sel normal lain (Dai, 2004). Upaya yang dapat dilakukan adalah meningkatkan pengembangan bahan alam sebagai terapi pendukung (agen kemopreventif). Salah satu bahan alam yang berpotensi untuk dikembangkan adalah herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*).

Berdasarkan analisis fitokimia, herba bandotan mengandung beberapa komponen senyawa seperti benzofuran, *chromene*, *chromone*, kumarin, alkaloid, steroid, triterpen, flavonoid (eupalestin dan nobiletin), monoterpen, dan sesquiterpen (Singh, 2013). Selain sebagai antiinflamasi, herba bandotan juga memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan antikanker (Acheampong, *et al.*, 2015).

Secara *in vitro*, kombinasi fraksi kloroform herba bandotan dan 5-Fluorourasil memiliki kemampuan cukup baik memicu proses apoptosis sel HeLa (Komalasari, 2017). Sedangkan secara *in vivo* ekstrak etanol herba bandotan mampu menurunkan ekspresi HER-2 (Prabowo, 2015).

Untuk mengembangkan penelitian sebelumnya, maka pada penelitian ini dilakukan uji secara *in vivo* dan *in silico*. Sebagai analisis awal, dilakukan uji *in silico* dengan metode *molecular docking* antara senyawa nobiletin pada fraksi kloroform herba bandotan (FKB) dibandingkan dengan 5-Fluorourasil (5-FU) terhadap protein VEGF, COX-2, dan HER-2. Ketiga protein ini adalah protein yang dapat mengekspresikan adanya tumor atau keganasan pada sel kanker payudara. Kemudian dilakukan analisis kandungan senyawa dalam herba bandotan

dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Sedangkan untuk uji *in vivo* dilakukan dengan menginduksi 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) serta FKB pada hewan uji tikus betina galur *Sprague dawley* kemudian dilakukan pengamatan dengan metode pengecatan Hematoksillin-Eosin (HE) serta uji Imunohistokimia (IHC) pada jaringan kelenjar payudara.

METODE PENELITIAN

Alat Penelitian

Seperangkat komputer, gelas ukur (*Pyrex*), pipet (*Pyrex*), bejana, mikroskop, *rotary evaporator* (*IKA RV10*), corong pisah (*Pyrex*), waterbath, kandang, bunsen, blok kayu, gelas objek (slide), oven (*Memmert*), blender, timbangan analitik (*Sartorius*), alat bedah, serta lampu UV 254 dan 366 nm.

Bahan Penelitian

Herba Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*), kloroform (*Bratachem*), etanol 70% (*Bratachem*), akuades, *Haematoxyllin*, *Eosin*, plat gel silika, struktur protein VEGF, COX-2, dan HER-2, *xylol*, methanol, aplikasi *Autodock Vina* dan seperangkat aplikasi lainnya, 7,12-dimethylbenz[a]antrasen (DMBA), *corn oil*, CMC-Na 0,5%, serta antibodi VEGF.

Subjek Uji

Sampel yang digunakan yaitu 20 ekor

tikus betina galur *Sprague dawley* yang berumur 40 hari dengan berat badan 40 sampai 60 gram. Terbagi menjadi 5 kelompok perlakuan, antara lain: K.DMBA, K.FKB, K.CMCNa, DMBA+FKB750, serta DMBA+FKB1500. K. DMBA merupakan kelompok kontrol karsinogenik dengan induksi DMBA dosis 20 mg/kg BB sebanyak 2 kali seminggu selama 5 minggu. K.FKB merupakan kelompok kontrol ekstrak dengan pemberian FKB dengan dosis 1.500 mg/kg BB diberikan setiap hari pada minggu keempat dan kelima. K.CMCNa merupakan kelompok kontrol pelarut dengan pemberian larutan CMC Na 0,5% setiap hari selama 5 minggu. DMBA+FKB 750 dan DMBA+FKB1500 merupakan kelompok perlakuan induksi DMBA dosis 20 mg/kg BB 2 kali seminggu selama 5 minggu dan diberikan FKB dengan variasi dosis 750 mg/kg BB dan 1500 mg/kg BB setiap hari pada minggu keempat dan kelima.

Pengamatan Histopatologi

Setelah perlakuan hewan uji selama 5 minggu, pada minggu ke-6 dilakukan nekropsi pada organ payudara dan diperoleh kelenjar payudara. Kemudian dibuat preparat histologi dan dilakukan pengecatan preparat menggunakan reagen Hematoxyllin dan Eosin untuk mengetahui pengaruh pemberian DMBA, CMCNa, FKB, maupun

kombinasinya terhadap histologi kelenjar payudara pada masing-masing kelompok. Selain itu juga dilakukan pengecatan preparat dengan metode Imunohistokimia menggunakan antibodi VEGF. Pengecatan preparat histologi ini digunakan untuk mengetahui histologi kelenjar payudara secara mikroskopis. Oleh karena itu pengamatan terhadap preparat histologi menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 12x hingga 300x.

Analisis Data

Berdasarkan pengamatan secara mikroskopis, hasil dari preparat pengecatan HE dapat diketahui secara deskriptif struktur jaringan kelenjar payudara pada masing-masing kelompok perlakuan. Sedangkan pada preparat Imunohistokimia dapat diketahui ekspresi dari antibodi VEGF pada histologi kelenjar payudara masing-masing kelompok. Ekspresi dari VEGF dihitung pada masing-masing lapang pandang dengan replikasi 3x sehingga diperoleh persentase ekspresi sel positif yang imunoreaktif terhadap antibodi VEGF.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi Tanaman

Herba Bantolan (*Ageratum conyzoides* L.) diperoleh dari daerah Kasihan, Bantul, Yogyakarta.

Tanaman yang diperoleh kemudian dilakukan determinasi tanaman yang menunjukkan bahwa tanaman tersebut sesuai dan termasuk pada suku Asteraceae. Tumbuhan kemudian dibuat menjadi serbuk halus melalui proses pengeringan dan penumbukan.

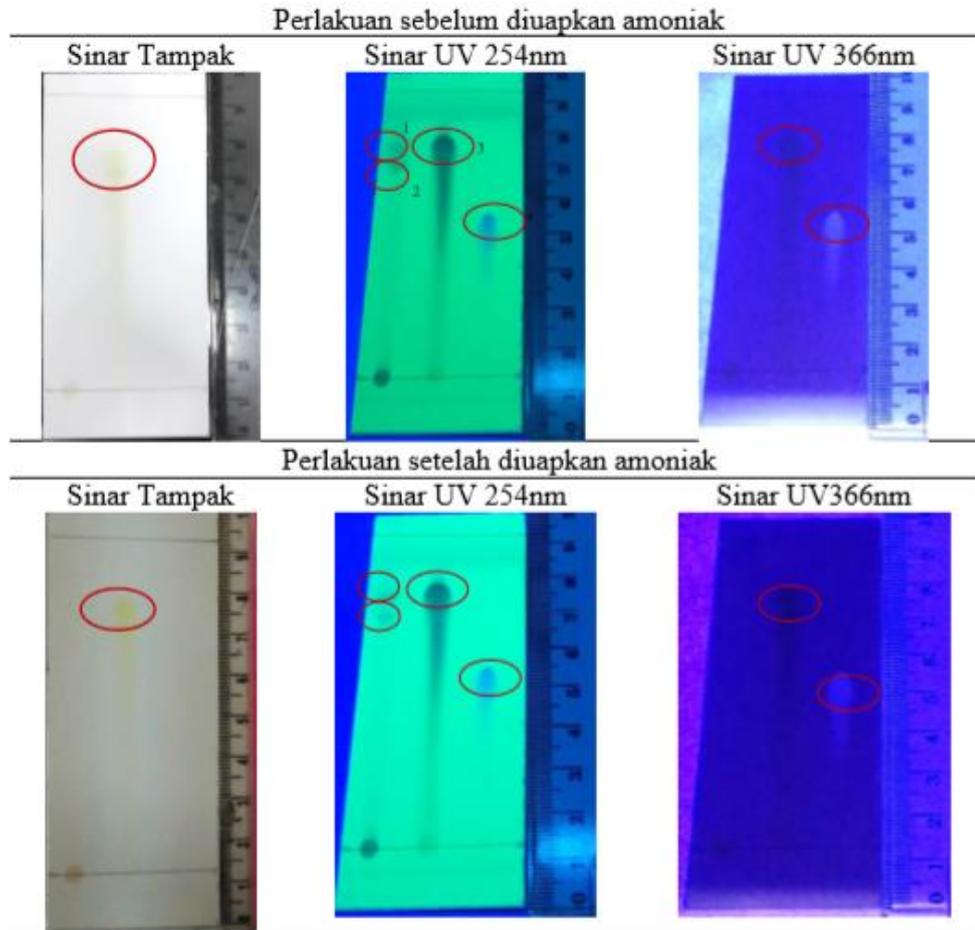
Ekstraksi dan Fraksinasi

Proses penyarian senyawa dengan metode maserasi menggunakan etanol 70% serta fraksinasi menggunakan kloroform. Diperoleh FKB kental dengan berat 17,4 gram dengan nilai rendemen 4,22%.

Identifikasi Senyawa dengan KLT

Hasil identifikasi senyawa dalam FKB dengan uji KLT menggunakan fase gerak metanol:kloroform 7:2 memiliki kemungkinan mengandung senyawa flavonoid. Berdasarkan bercak yang terbentuk (**Tabel 1.**) serta nilai Rf (**Tabel 2.**) masing-masing, senyawa uji FKB (0,75 dan 0,812) memiliki nilai yang hampir sama dengan pembanding flavonoid berupa rutin (0,837). Hal ini menunjukkan bahwa FKB mengandung senyawa flavonoid dengan sub golongan yang berbeda dengan senyawa pembanding. Terbentuknya bercak yang berbeda terjadi karena beberapa faktor diantaranya kepolaran fase diam, fase gerak, maupun sampel itu sendiri.

Tabel 1. Profil Kromatografi



Tabel 2. Hasil perhitungan nilai Rf KLT

No Bercak	Nilai Rf	Pengamatan sebelum diuapkan amoniak		Pengamatan setelah diuapkan amoniak			Hasil	
		Sinar tampak	UV 254nm	UV 366 nm	Sinar tampak	UV 254 nm		UV 366 nm
1	0,75	-	Ungu muda	-	-	Ungu muda	-	+
2	0,812	-	Ungu muda	-	-	Ungu muda	-	+
3	0,837	Kuning	Ungu tua	Ungu tua	Kuning tua	Ungu tua	Ungu tua	+
4	0,537	-	Ungu muda	Putih terang	-	Ungu muda	Putih terang	-

Molecular Docking

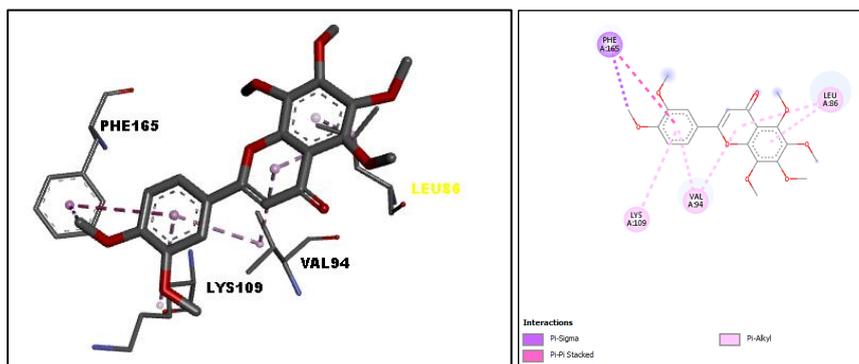
Berdasarkan uji *in silico* menggunakan *molecular docking* nobiletin dan 5-FU terhadap protein VEGF (5XV7) dan COX-2 (5IKQ) menunjukkan afinitas ikatan yang baik. Merujuk pada skor *docking* (Tabel 3.) masing-masing interaksi senyawa uji dengan protein target, hasil terbaik ditunjukkan pada interaksi antara nobiletin dengan VEGF yang memiliki skor *docking* -7,6 kcal/mol dibandingkan terhadap COX-2 yang memiliki skor *docking* -7,5 kcal/mol. Hal ini menunjukkan semakin rendah skor *docking*, energi

ikatan yang terbentuk berbanding terbalik dengan afinitas ikatannya.

Sebagai pembandingan digunakan agen kemoterapi kanker payudara yaitu 5-FU. Hasil menunjukkan bahwa 5-FU memiliki skor *docking* lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa nobiletin. Maka senyawa nobiletin memiliki afinitas ikatan yang lebih baik dengan energi ikatan lebih rendah dibandingkan dengan 5-FU dengan energi ikatan yang tinggi, sehingga sudah mampu berikatan dengan protein target VEGF dengan baik

Tabel 3. Hasil Uji *Molecular Docking*

No	Senyawa Uji	Protein Target	Nilai RMSD (<2,00 Å)	Score Docking (kcal/mol)	Konformasi Asam Amino
1	Nobiletin	COX-2	1,038	-7,5	Konformasi 4
		VEGF	1,122	-7,6	Konformasi 6
		HER-2	1,461	-6,3	Konformasi 2
2	5-FU	COX-2	1,927	-5,2	Konformasi 6
		VEGF	1,534	-4,7	Konformasi 3
		HER-2	1,593	-5,6	Konformasi 2



Gambar 1. Visualisasi Ikatan Nobiletin pada protein VEGF (5XV7)

Pengecatan Hematoksillin-Eosin

Pada minggu ke-5 setelah induksi agen karsinogenik DMBA serta pemberian FKB, nodul belum tampak secara makroskopis. Akan tetapi terjadi penurunan aktivitas pada tikus yang terinduksi DMBA. Oleh karena itu dilakukan nekropsi kelenjar mammae tikus. Organ kemudian diambil jaringannya untuk dibuat preparat dan dilakukan pengecatan menggunakan HE dan Imunohistokimia menggunakan antibody VEGF (skor *docking* terbaik).

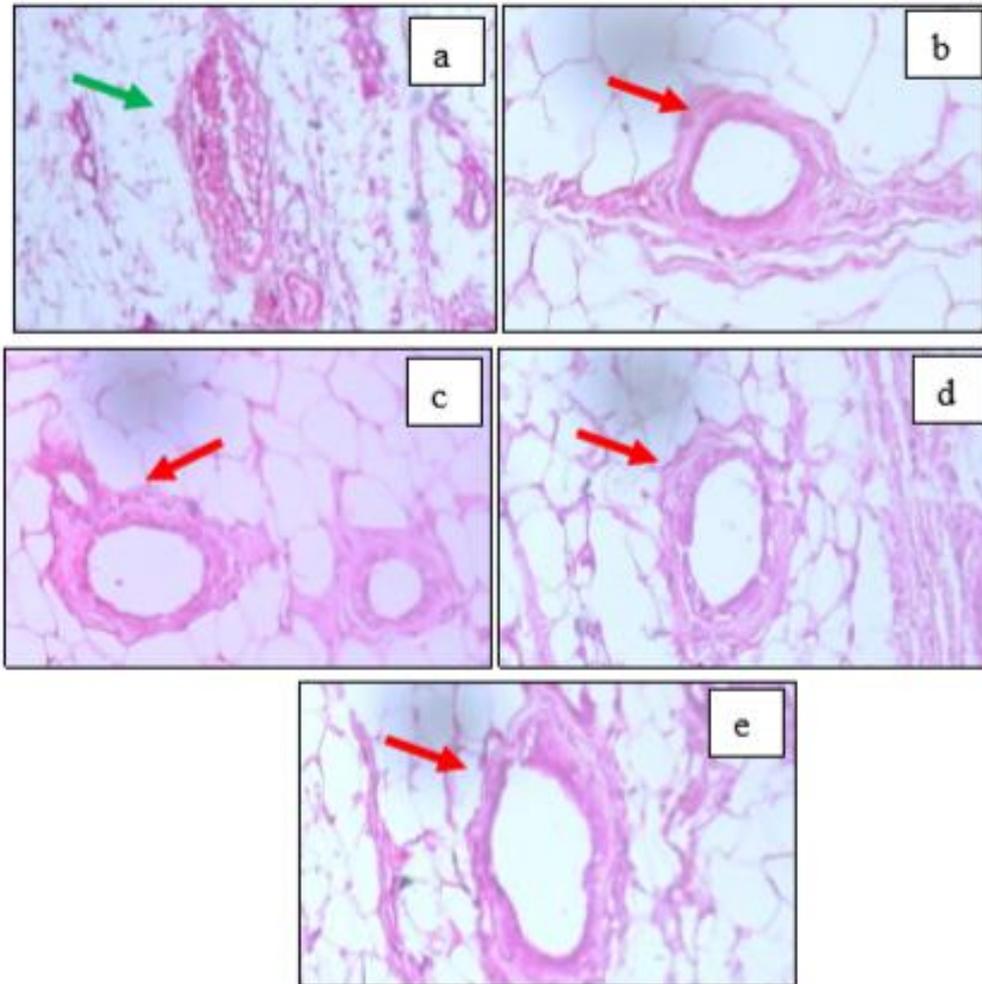
Secara mikroskopis pada preparat kelenjar mammae dengan pewarnaan HE, menunjukkan adanya perubahan histologi masing-masing kelompok perlakuan. Komponen yang terdapat pada jaringan kelenjar mammae terdiri dari duktus, jaringan lemak, adenomer serta fibroblast. Perubahan tampak terjadi pada duktus dan jaringan lemak pada kelompok perlakuan DMBA serta pada kelompok pemberian FKB dosis tertentu. Duktus pada sel normal (Gambar 2.c) hanya dilapisi oleh satu lapis sel epitel yang tipis, namun pada kelompok induksi DMBA (Gambar 2.a), terdapat lapisan sel epitel yang tidak beraturan. Pada kelompok pemberian FKB (Gambar 2.d dan 2.e), juga hanya terbentuk satu lapis sel epitel layaknya kelompok tanpa induksi DMBA. Hal

ini menunjukkan bahwa FKB pada tikus yang terinduksi DMBA memiliki pengaruh pada jaringan kelenjar mammae dengan pengecatan HE dan pengamatan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 120x.

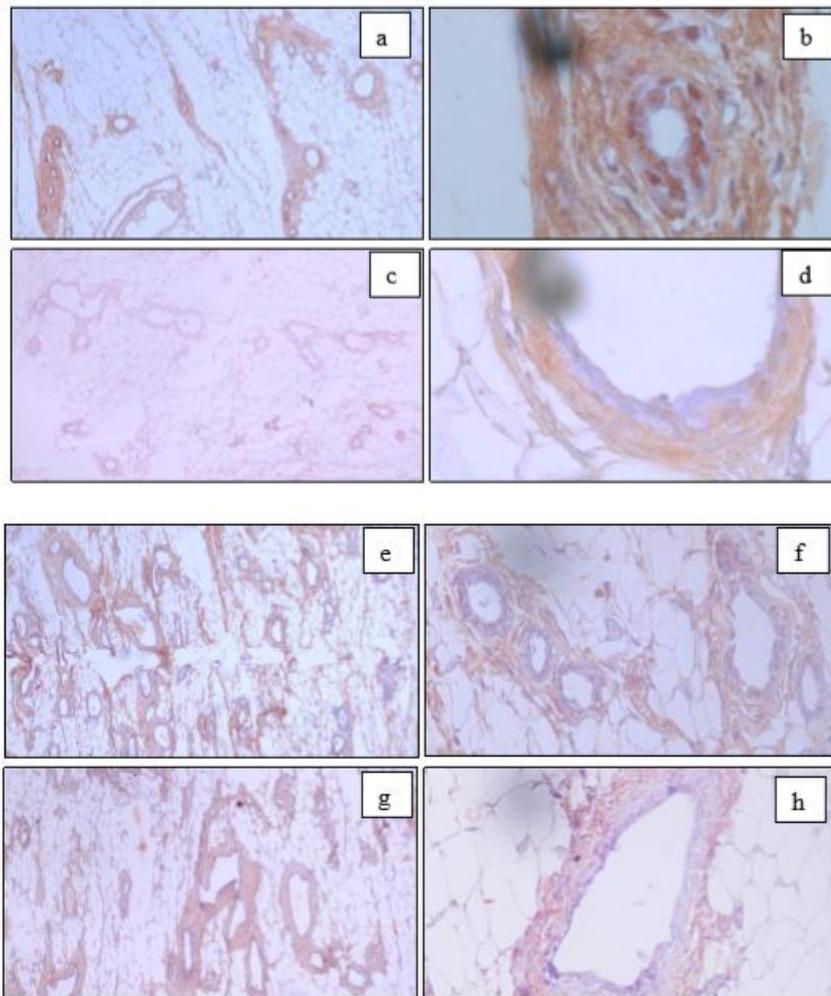
Imunohistokimia

Pengecatan preparat histologi kelenjar mammae dengan imunohistokimia, tampak perubahan histologi jaringan berwarna coklat pada sel yang imunoreaktif spesifik terhadap antibody VEGF tersebut. Pada histologi kelompok tikus terinduksi DMBA (Gambar 3.a dan 3.b) menunjukkan bahwa sel memiliki imunoreaksi yang cukup kuat terhadap antibody VEGF, sedangkan pada kelompok pemberian FKB (Kelompok B) (Gambar 3.c dan 3.d) sel memiliki imunoreaksi yang rendah ditunjukkan dengan warna coklat yang sedikit dan lebih dominan ungu terhadap antibody VEGF. Pada kelompok dengan pemberian DMBA dan FKB dosis 1500 mg/kg BB (Gambar 3.g dan 3.h), menunjukkan imunoreaksi yang lebih kuat dibandingkan dengan pada kelompok induksi DMBA dan FKB dosis 750 mg/kg BB (Gambar 3.e dan 3.f). Hal ini menunjukkan bahwa FKB dosis 1500 mg/kg BB memiliki potensi sebagai agen kemopreventif kanker payudara berdasarkan uji

imunohistokimia antibody VEGF.



Gambar 2. Gambaran histologi kelenjar mammae dengan pengecatan HE pada pengamatan mikroskop cahaya perbesaran 120x.



Gambar 3. Gambaran histopatologi kelenjar mammae dengan Imunohistokimia

Mekanisme Kerja FKB terhadap VEGF

Angiogenesis atau pembentukan pembuluh darah baru yang abnormal dipicu oleh reseptor VEGF yang teraktivasi akibat pasokan oksigen yang kurang pada jaringan sehingga mempengaruhi sirkulasi darah. Kemudian VEGF tersebut menyebar pada jaringan di sekitarnya dan berikatan dengan reseptor spesifik

pada sel endotel yang berdekatan dengan pembuluh darah tersebut. Setelah berikatan, sinyal-sinyal aktif dikirim dari permukaan sel nucleus kemudian memproduksi enzim-enzim. Enzim kemudian mencerna lubang-lubang pada membrane basalis yang menyelubungi pembuluh darah. Sel-sel endotel kemudian berproliferasi dan migrasi pada pembuluh darah yang telah rusak

menuju ke jaringan yang telah mengalami tumor di awal. Enzim-enzim MMPs diproduksi bersamaan dengan perluasan pembuluh darah baru dan kemudian membentuk membrane basalis.

Sehingga pada penelitian ini menunjukkan hasil bahwa FKB memiliki peran secara molekuler melalui faktor angiogenik VEGF. Apabila protein VEGF dihambat kerjanya, maka proses angiogenesis juga akan menurun. Penghambatan angiogenesis ini pada tingkat seluler akan menghambat abnormalitas sel kanker sehingga tidak terjadi metastasis.

Berdasarkan hasil penelitian diatas, maka FKB dosis 1500 mg/kg BB mampu menghambat kerja VEGF sebagai faktor angiogenesis pada kelenjar mammae. Akan tetapi diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai efektivitas FKB pada variasi dosis tertentu

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Fraksi kloroform herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) mengandung senyawa golongan flavonoid.
2. Senyawa nobiletin fraksi kloroform herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) menunjukkan nilai afinitas ikatan yang tinggi (energi ikatan rendah) pada protein VEGF dengan skor

docking -7,6 kcal/mol.

3. Fraksi kloroform herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) mempunyai efek kemopreventif pada tikus betina galur *Sprague dawley* yang terinduksi DMBA berdasarkan uji histologi kelenjar payudara. Berdasarkan uji Hematoksillin-Eosin, FKB mampu menghambat kerusakan sel pada kelenjar payudara. Selain itu, FKB juga mampu menghambat ekspresi VEGF berdasarkan uji pewarnaan Imunohistokimia menggunakan antibodi VEGF.
4. Dosis terapeutik optimal FKB yang diberikan adalah 1500 mg/kg BB berdasarkan jumlah ekspresi VEGF pada histopatologi kelenjar payudara yaitu 15,51%.

Saran

1. Perlu dilakukan identifikasi senyawa menggunakan metode yang lebih spesifik.
2. Perlu adanya masa tunggu munculnya nodul pada hewan uji dengan induksi agen karsinogenik DMBA kemudian diukur volume nodul secara bertahap.
3. Penelitian selanjutnya disarankan untuk menggunakan variasi dosis berdasarkan dosis terapeutik FKB 1500 mg/kg BB.
4. Diperlukan analisis data secara kuantitatif menggunakan pengolahan data untuk mengetahui pengaruh dan signifikansi antar perlakuan

DAFTAR PUSTAKA

- Acheampong Felix [et al.]. 2015. *In Vitro Antioxidant and Anticancer Properties of Hydroethanolic Extracts and Fractions of Ageratum conyzoides* [Jurnal] // *European Journal of Medicinal Plants*. - hal. 2015-214.
- Alen, Yohannaes., Agresa, FL., Yuliandra, Yori. 2017. Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Aktivitas Antihiperurisemia Ekstrak Rebung *Schizostachyum brachycladum* Kurz (Kurz) pada Mencit Putih Jantan. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 3(2), 146-152.
- Anonim. 2011. *Thin Layer Chromatography Chemistry 136*.
- Anonim, 2011. *Chem 344 Thin Layer Chromatography*.
- Dai, M. 2004. Antiproliferative effect of Pentagamavunon-0 on Myeloma cells [Jurnal]. - Yogyakarta : Sains Kesehatan FK Universitas Gajah Mada.
- Ferreira, LG., Dos Santos, RN., Oliva, G., Andricopus, AD. (2015). *Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies*. *Molecules* 2015,20, 13384-13421
- Fitricia, Irene., Winarni, Dwi., Pidada, I.B. Rai. 2012. Pengaruh Pemberian Tomat (*Solanum lycopersicum* L.) Terhadap Histologi Kelenjar Mammae Mencit Yang Diinduksi 7,12-Dimethylbenz(A)antrasena (DMBA). *Jurnal Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam/ Vol.15 No.2*.
- Galati E.M [et al.]. 2008. *Anti-inflammatory and Antioxidant Acticity of Ageratum conyzoides* [Jurnal] // *Pharmaceutical Biology*. - Italy : [s.n.] - Vol. 39. - hal. 336-339.
- Gandjar, IG dan Abdul Rohman. 2015. *Kimia Farmasi Analisis* [Buku]. - Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- Hajnos, Monika Waksmundzka., Sherma Joseph., Teresa Kowalska. 2007. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. [Handbook]. Chromatographic Science Series Volume 99*. CRC Press.
- Hejmadi, Momna. 2007. *Introduction to Cancer Biology* [Buku]. - [s.l.] : e-book.
- Komalasari, Titi. 2017. Uji Aktivitas Fraksi Kloroform Herba Bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) dan 5-Fluorourasil sebagai Ko-Kemoterapi pada Sel Kanker Serviks HeLa secara In Vitro dan In Silico [Skripsi]. - Yogyakarta : FKIK UMY.
- Liska Jan., Brtko, Julius, dkk., 2016. *Relationship between histology, development and Tumorigenesis of Mammary Gland in Female Rat. [Review]. Exp. Anim* 65(1), 1-9.
- Markham, K. R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata. ITB: Bandung.
- Meiyanto, Edy., dkk., 2007. Efek Kemopreventif Ekstrak Etanolik *Gynura procumbens* (Lour) Merr pada Karsinogenesis Kanker

- Payudara Tikus. *Majalah Farmasi Indonesia* 18(3), 154-161.
- Meiyanto, Edy., dkk., 2012. *Natural Products for Cancer-Targeted Therapy: Citrus Flavonoids as Potent Chemopreventive Agents. [Review]. Asian Pasific Journal of Cancer Prevention. Vol.13, 2012*
- Prabowo, Dodi. 2015. *Upaya Pengembangan Herba Bandotan sebagai Kemopreventif Kanker Payudara [Skripsi]. - Yogyakarta : FKIK UMY, 2015.*