

Research Article

**EFFECT *Tithonia diversifolia* ((HEMLEY) A. GRAY) ETHANOL
EXTRACT AS ANTIMALARIAL ON MICE STRAIN BALB / C BEFORE
AND AFTER INFECTED BY *Plasmodium berghei***

Wiwien Sugih Utami^{*}, Nuri^{**}, Yunita Armiyanti^{*}

^{*}Jember University, Faculty of Medicine, Jember

^{**}Jember University, Faculty of Pharmacy, Pharmacy Biology, Jember

ABSTRACT

Introduction. Antimalarial resistance of *Plasmodium* sp encourage the study of new antimalarial drugs, such as the traditional medicinal plants used to treat malaria, kembang bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemley) A. Gray). Kembang bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemley) A. Gray) (Asteraceae family) have activity as an antimalarial, anti-inflammatory and analgesic. In vitro, ethanol extract of these leaf had been proven that it was active in inhibiting the growth of *P. berghei* at doses of 40; 80; 160; and 320 mg/kg body weight with IC₅₀ values of 114 mg / kg body weight and the IC₉₀ of 475 mg/kg body weight. *Tithonia diversifolia* extract contains of substances that could be used as an antimalarial prophylactic and curative in malaria. **Objective:** to determine the effect of ethanol extract of leaf development as a antimalaria month. **Methods** is observing the effect of ethanol extract of kembang bulan to parasitemia levels on mice Balb / C before and after infection by the parasite *Plasmodium berghei* (parasitemia degree of mild, moderate and severe. **Result.** Based on data from the various percentages of inhibition of extract ethanol of kembang bulan leaf for growth in *P. berghei* before infected and at various stadium of infection (mild, moderate, and severe), can be seen that in the prophylaxis group had the greatest percentage of inhibition. **Conclusion.** The *Tithonia diversifolia* leaves ethanol extract have antimalarial activity in mice Balb/c before inoculated *Plasmodium berghei* (prophylaxis) and after mild (1%), moderate (5%), and severe (10%).

Keywords: *Tithonia diversifolia*, antimalarial, *Plasmodium berghei*

Research Article

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL *Tithonia diversifolia*
((HEMLEY) A. GRAY) SEBAGAI ANTIMALARIA
PADA MENCIT GALUR BALB/C SEBELUM DAN SESUDAH
DIINFEKSI *Plasmodium berghei*

Wiwien Sugih Utami*, Nuri**, Yunita Armiyanti*

*Universitas Jember, Fakultas Kedokteran, Jember

** Universitas Jember, Fakultas Farmasi, Farmasi Biologi, Jember

ABSTRAK

Pendahuluan. Resistensi antimalaria terhadap *Plasmodium sp* mendorong penelitian obat antimalaria baru antara lain dengan tanaman obat tradisional yang digunakan untuk mengobati malaria, seperti Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray). Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemley) A. Gray) termasuk keluarga Asteraceae dan memiliki aktivitas antimalaria, anti-inflamasi dan analgesik. Secara *in vitro*, ekstrak etanol daun ini telah terbukti aktif menghambat pertumbuhan *P. berghei* pada dosis 40; 80; 160, dan 320 mg / kgBB dengan nilai IC₅₀ 114 mg / kg BB dan IC₉₀ 475 mg/kg BB. Ekstrak *Tithonia diversifolia* mengandung zat antimalaria untuk terapi profilaksis malaria dan kuratif. **Tujuan:** untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun kembang Bulan sebagai antimalaria. **Metode** penelitian dilakukan dengan mengamati efek ekstrak etanol kembang bulan terhadap tingkat parasitemia mencit Balb/C sebelum dan sesudah terinfeksi oleh parasit *Plasmodium berghei* (derajat parasitemia ringan, sedang dan berat). **Hasil.** Berdasarkan data berbagai persentase penghambatan ekstrak etanol daun kembang bulan untuk pertumbuhan *P. berghei* sebelum terinfeksi dan pada berbagai stadium infeksi (ringan, sedang, dan berat), ternyata pada kelompok profilaksis memiliki derajat penghambatan yang paling besar. **Simpulan.** Ekstrak etanol *Tithonia diversifolia* memiliki aktivitas antimalaria pada mencit Balb/C sebelum diinokulasi *Plasmodium berghei* (profilaksis) dan sesudah terinfeksi pada stadium ringan (1%), sedang (5%), dan berat (10%).

Kata kunci: *Tithonia diversifolia*, antimalaria, *Plasmodium berghei*

PENDAHULUAN

Malaria merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Plasmodium sp*. Parasit ini bersifat intraseluler, yang ditularkan oleh gigitan nyamuk Anopheles betina. Ada empat *Plasmodium sp* yang dapat menginfeksi manusia yaitu: *P.falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* dan *P. ovale*. Spesies yang banyak ditemui di Indonesia adalah *P. falciparum* dan *P. vivax*.¹

Malaria masih merupakan masalah kesehatan utama di Indonesia terutama di Indonesia bagian timur. Terdapat 433.326 kasus dari 232 juta penduduk Indonesia pada tahun 2005.² dan terjadi ledakan kasus malaria pada beberapa daerah yang menyebabkan 87 kematian dari 18.812 kasus di 62 desa di Indonesia pada tahun 2005.² Sebesar 90% mortalitas yang berkaitan dengan infeksi *P.falciparum* di seluruh dunia disebabkan oleh malaria berat.³

Besarnya angka kematian akibat malaria berat tersebut kemungkinan diakibatkan ketidakefektifan obat yang diberikan. Hal ini terjadi karena pada umumnya pasien penderita malaria diberi terapi klorokuin, karena klorokuin merupakan obat pilihan utama untuk

Research Article

pengobatan dan pencegahan semua jenis malaria yang dipakai dalam program pemberantasan malaria.⁴ Sedangkan klorokuin merupakan obat pilihan utama (*first line drug*) untuk pengobatan malaria tanpa komplikasi.⁵ Padahal pasien yang datang tidak semua menderita malaria tanpa komplikasi (malaria stadium ringan), tidak jarang pula pasien menderita malaria dengan komplikasi (malaria stadium berat), sehingga pengobatan menggunakan klorokuin sebagai *first line drug* ini menjadi tidak efektif.

Berbagai macam usaha telah dilakukan untuk mengatasi malaria pada berbagai stadium ini antara lain dengan menghindari gigitan nyamuk Anopheles, membunuh nyamuk dewasa, membunuh jentik, mengurangi tempat perindukan, mengobati penderita malaria, vaksinasi, dan pemberian pengobatan pencegahan, tetapi kasus malaria masih tetap tinggi.⁶ Tingginya kasus malaria ini disebabkan karena munculnya berbagai macam hambatan dalam pemberantasan malaria, diantaranya resistensi parasit terhadap obat-obat malaria.⁷

Timbulnya resistensi *Plasmodium sp* terhadap antimalaria mendorong para peneliti mencari antimalaria baru untuk menggantikan antimalaria yang tidak efektif lagi. Salah satu usaha menemukan antimalaria baru adalah melalui penelitian terhadap tanaman obat yang digunakan secara tradisional oleh masyarakat untuk mengobati malaria. Salah satu tanaman obat yang digunakan sebagai antimalaria adalah kembang bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray).⁸

Kembang bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemley) A. Gray) merupakan spesies tumbuhan yang termasuk dalam family Asteraceae. Tumbuhan ini secara empirik telah lama oleh masyarakat di Asia Selatan, Amerika Tengah, dan Afrika digunakan untuk mengobati beberapa macam penyakit. Di Guatemala, Taiwan, Meksiko dan Nigeria ekstrak air panas herba tumbuhan ini digunakan dalam pengobatan malaria.⁸ Herbal tumbuhan ini dilaporkan memiliki aktivitas sebagai antimalaria (Madureira *et al.*, 2002), antiinflamasi dan analgesik.⁹

Secara *in vivo*, ekstrak etanol daun kembang bulan terbukti aktif melawan *P. berghei* pada dosis 40; 80; 160; dan 320 mg/kgBB dengan nilai IC₅₀ sebesar 114 mg/kgBB dan IC₉₀ sebesar 475 mg/kgBB.¹⁰ Selain itu ekstrak *Tithonia diversifolia* mengandung substansi antimalaria yang dapat digunakan sebagai profilaksis dan kuratif pada malaria. Hal ini dibuktikan oleh Oyewole *et al.*,¹¹ yang meneliti ekstrak air dan ekstrak methanol *Tithonia diversifolia* dapat menghambat pertumbuhan parasit *Plasmodium berghei* dalam darah hingga 50% apabila diberikan sebelum mencit terinfeksi malaria pada dosis 100mg/kgBB.

Berdasarkan atas data-data di atas, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah ekstrak etanol daun kembang bulan memiliki pengaruh terhadap derajat parasitemia

Research Article

mencit galur Balb/C sebelum dan setelah diinfeksi parasit *Plasmodium berghei* (pada derajat parasitemia ringan, sedang, dan berat).

METODE PENELITIAN

Sampel Penelitian

Mencit jantan galur Balb/C yang didapat dari Bagian Ilmu Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kembang Bulan

Daun yang telah disortasi dicuci, kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Simplisia daun kering diblender dan diayak sehingga memperoleh serbuk halus. Serbuk halus yang dihasilkan kemudian dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol teknis sebanyak 5-10 kali dari berat serbuk kering selama 24 jam sambil sesekali diaduk. Ekstrak yang dihasilkan disaring dengan corong untuk diperoleh filtratnya. Residu dimaserasi ulang dengan etanol teknis sebanyak lima kali. Pemekatan ekstrak dilakukan dengan rotavapor sampai diperoleh ekstrak kental.

Pengujian Profilaksis

Mencit perlakuan diberi suspensi ekstrak etanol dosis 475 mg/kg BB selama 3 hari sebelum di inokulasi *Plasmodium berghei* secara intraperitoneal. Suspensi ekstrak etanol sebanyak sebanyak 0,2 mL. Setelah diinokulasi kelompok uji diberikan bahan uji secara per oral sesuai dengan dosis mulai hari pertama (H_0) sampai hari ke-5 (H_4). Derajat Parasitemia diukur mulai H_0 sampai dengan H_4 .

Pengujian Antimalaria pada Berbagai Stadium

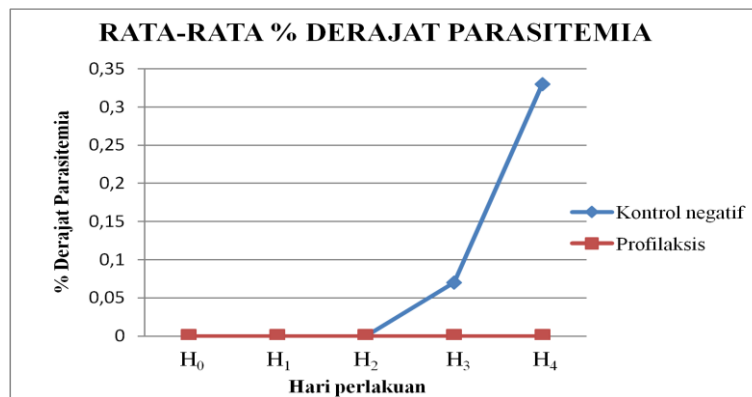
Uji antimalaria pada berbagai stadium dilakukan pada 3 kelompok yang telah diinokulasi *P.berghei* yaitu derajat parasitemia stadium ringan, stadium sedang, dan stadium berat. Suspensi ekstrak etanol sebanyak sebanyak 0,2 mL disiapkan pada alat sonde yang akan digunakan. Kelompok uji diberikan bahan uji secara per oral sesuai dengan dosis selama 3 hari (H_0 sampai dengan H_4). Derajat Parasitemia diukur pada H_0 (setelah mencapai stadium infeksi ringan, sedang dan berat) dan H_4 (setelah pemberian ekstrak etanol daun kembang bulan selama 4 hari) sesuai dengan metode uji antimalaria Peter's Test yang dimodifikasi. Uji normalitas dengan *kolmogorov – smirnov* dilakukan untuk mengetahui normal atau tidaknya distribusi data. Analisis yang digunakan adalah *oneway ANOVA* uji lanjutan *LSD*.

Research Article

HASIL PENELITIAN

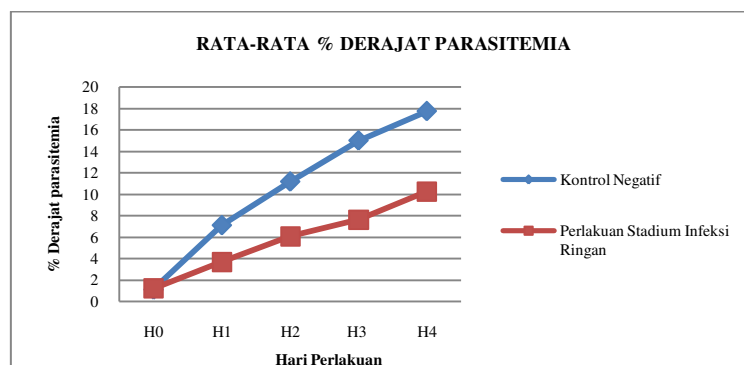
Didapatkan hasil penelitian dengan melakukan pemberian ekstrak etanol daun kembang bulan dosis 475 mg/kgBB terhadap derajat parasitemia mencit Balb/C sebelum diinfeksi *Plasmodium berghei* dan pada berbagai stadium infeksi (ringan, sedang, dan berat) sebagai berikut:

Kelompok profilaksis memiliki angka derajat parasitemia yang lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol negatif (gambar 1).



Gambar 1. Rata-rata Derajat Parasitemia Kelompok Perlakuan Profilaksis dan Kelompok Kontrol Negatif

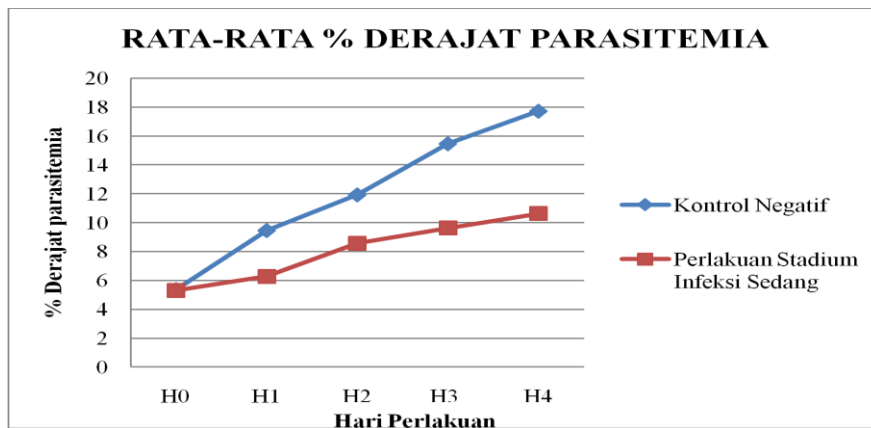
Kelompok stadium infeksi ringan memiliki angka derajat parasitemia yang lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol negatif (gambar 2).



Gambar 2. Rata-rata Persentase Derajat Parasitemia pada Kelompok Perlakuan Stadium Infeksi Ringan dan Kelompok Kontrol Negatif

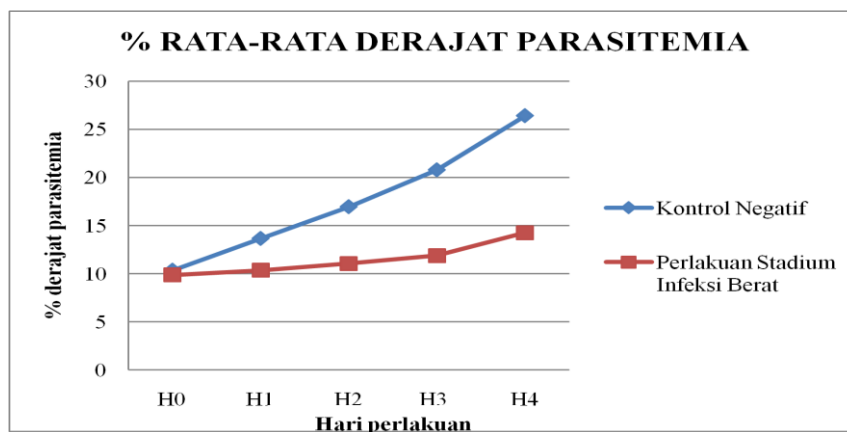
Kelompok stadium infeksi sedang memiliki angka derajat parasitemia yang lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol negatif (gambar 3).

Research Article



Gambar 3. Rata-rata Persentase Derajat Parasitemia pada Kelompok Perlakuan Stadium Infeksi Sedang dan Kelompok Kontrol Negatif

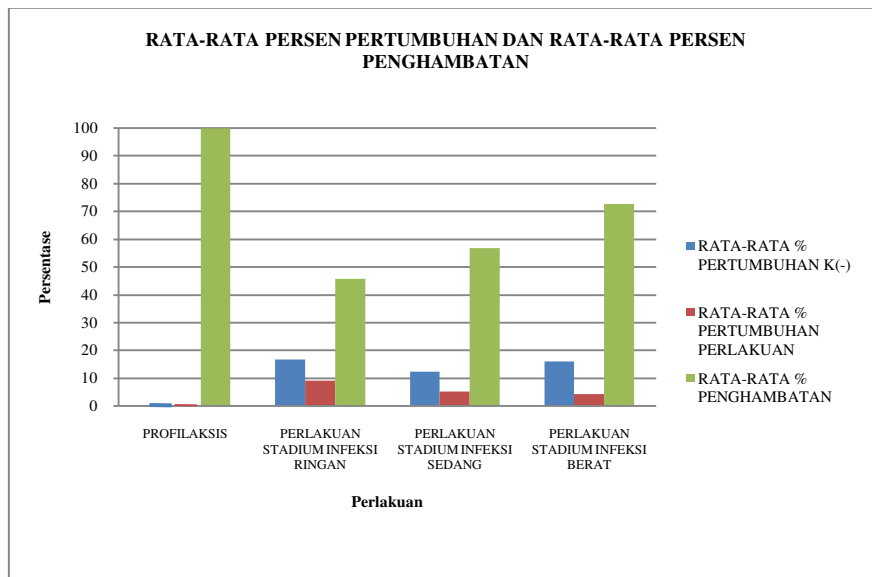
Kelompok stadium infeksi berat memiliki angka derajat parasitemia yang lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol negatif (gambar 4).



Gambar 4. Rata-rata Persentase Derajat Parasitemia pada Kelompok Perlakuan Stadium Infeksi Berat dan Kelompok Kontrol Negatif

Berdasarkan data dari berbagai persentase penghambatan etanol daun kembang bulan terhadap pertumbuhan *P. berghei* sebelum diinfeksi dan pada berbagai stadium infeksi (ringan, sedang, dan berat), dapat diketahui bahwa pada kelompok profilaksis memiliki persentase penghambatan paling besar (gambar 5).

Research Article



Gambar 5. Rata-rata persentase pertumbuhan dan rata-rata persentase penghambatan ekstrak etanol daun kembang bulan terhadap pertumbuhan *P. berghei* sebelum diinfeksi dan pada berbagai stadium infeksi (ringan, sedang, dan berat)

Berdasarkan data yang diperoleh selanjutnya dilakukan uji normalitas dengan menggunakan uji *Kolmogorov-smirnov* untuk melihat apakah data-data yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak. Hasil uji normalitas didapatkan signifikansi $p > 0,05$ yang menunjukkan data dari setiap kelompok terdistribusi normal. Oleh karena data berdistribusi normal maka dilakukan uji parametrik dengan uji *Oneway Anova* untuk membandingkan efektifitas pengaruh ekstrak etanol daun kembang bulan baik sebagai profilaksis sebelum inokulasi *Plasmodium berghei* maupun sebagai antimalaria pada berbagai stadium malaria. Berdasarkan hasil analisis data dengan *One way Anova* diperoleh taraf signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$), artinya terdapat perbedaan yang signifikan hambatan parasitemia oleh ekstrak etanol daun kembang bulan.

Selanjutnya dilakukan uji *LSD* untuk mengetahui hambatan parasitemia oleh ekstrak etanol daun kembang bulan antara kelompok perlakuan yang satu dengan yang lain. Taraf kepercayaan yang digunakan adalah 95% yang artinya jika didapat nilai signifikansi $< 0,05$ maka terdapat perbedaan yang signifikan antara perlakuan yang dibandingkan terhadap perlakuan yang lain

Berdasarkan hasil uji *LSD* hambatan parasitemia pada kelompok perlakuan profilaksis dibandingkan dengan kelompok perlakuan pada stadium ringan dan sedang didapatkan nilai signifikansi $p = 0,000$ ($< 0,05$). Jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan pada stadium berat didapatkan nilai signifikansi $p = 0,002$ ($< 0,05$), hal ini berarti terdapat perbedaan yang signifikan

Research Article

antara kelompok perlakuan profilaksis dengan kelompok perlakuan pada stadium ringan, sedang, dan berat.

Pada kelompok perlakuan stadium ringan dibandingkan dengan kelompok stadium sedang didapatkan nilai signifikansi $p=0,112$, hal ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara stadium ringan dengan stadium sedang. Jika dibandingkan dengan kelompok stadium berat didapatkan nilai signifikansi $p=0,003$, hal ini berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara stadium ringan dengan stadium berat. Pada kelompok perlakuan stadium sedang dibandingkan dengan kelompok stadium berat didapatkan nilai signifikansi $p=0,036$, hal ini menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antara stadium sedang dengan stadium berat.

DISKUSI

Uji pengaruh ekstrak etanol daun kembang bulan terhadap derajat parasitemia sebelum diinfeksi dan setelah diinfeksi *Plasmodium berghei* pada berbagai stadium infeksi yaitu ringan, sedang dan berat, bertujuan untuk melihat potensi daun kembang bulan sebagai profilaksis dan kuratif malaria yang dapat digunakan pada berbagai stadium infeksi. Dari hasil analisa data penelitian didapatkan bahwa ekstrak etanol daun kembang bulan terbukti memiliki pengaruh terhadap derajat parasitemia sebelum dan sesudah diinfeksi *Plasmodium berghei* pada stadium ringan, sedang, dan berat. Hal ini sesuai dengan hipotesis bahwa ekstrak etanol daun kembang bulan mempunyai pengaruh sebagai profilaksis pada mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* dan terapi antimalaria pada mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* stadium ringan, sedang dan berat.

Berdasarkan data penelitian diketahui bahwa persentase derajat parasitemia pada kelompok profilaksis, yaitu kelompok mencit yang sudah diberi ekstrak etanol daun kembang bulan dosis 475 mg/kgBB tiga hari sebelum diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*, menunjukkan angka yang lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kembang bulan memiliki pengaruh sebagai profilaksis malaria dengan memiliki daya hambat terhadap perkembangan parasit. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Oyewole *et al.*,¹¹ yang menyatakan bahwa ekstrak air dan ekstrak methanol daun kembang bulan lebih efektif bila diberikan sebelum onset infeksi.

Berdasarkan hasil penelitian pada kelompok perlakuan berbagai stadium infeksi yaitu derajat parasitemia ringan, derajat parasitemia sedang dan derajat parasitemia berat, pemberian ekstrak etanol daun kembang bulan dosis 475 mg/kgBB menunjukkan rata-rata derajat parasitemia yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan

Research Article

bahwa ekstrak etanol memiliki pengaruh sebagai antimalaria pada berbagai stadium infeksi dengan menekan pertumbuhan parasit, walaupun tidak seratus persen membunuh parasit. Hasil penelitian ini mendukung penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa pemberian ekstrak metanol dan ekstrak air daun kembang bulan dapat menurunkan derajat parasitemia dan memperpanjang usia mencit dibandingkan kelompok kontrol, namun tidak dapat mencegah mortalitas akibat anemia berat.¹¹

Daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) terbukti memiliki pengaruh terhadap derajat parasitemia pada mencit sebelum diinfeksi *Plasmodium berghei* dan pada mencit setelah diinfeksi *Plasmodium berghei* pada berbagai stadium malaria (1%, 5%, 10%). Kemampuan ekstrak daun kembang bulan sebagai antiplasmodium tersebut karena mengandung bahan aktif yang disebut *sesquiterpene lactone taginin C* yang sudah terbukti dapat membunuh *Plasmodium falciparum* strain FCA (IC₅₀ : 0,75 µg/ mL).¹² Afiyah,¹³ menyatakan bahwa fraksi eter ekstrak methanol daun kembang bulan mempunyai aktivitas antiplasmodium pada *P. falciparum* strain FCR-3 secara *in vitro* dengan cara menghambat polimerisasi heme. Kemampuan suatu antiplasmodium dalam menghambat polimerisasi heme berlangsung dengan kemampuannya sebagai antimalaria, walaupun diketahui bahwa mekanisme kerja antiplasmodium tidak hanya melalui penghambatan heme. Aktivitas penghambatan polimerisasi heme sebenarnya merupakan kerja satu atau dua mekanisme, yaitu (1) terjadi interaksi antara senyawa terpenoid, fenol dan sterol dengan sistem elektrolit heme, (2) ekstrak-ekstrak ini terdiri dari senyawa-senyawa yang memiliki gugus hidroksil yang dapat berikatan dengan ion besi heme¹². Goffin *et al.*,¹⁴ melaporkan bahwa ekstrak kembang bulan secara *in vitro* mampu melawan tiga strain *P. falciparum* dimana ekstrak eter herba tumbuhan ini memiliki aktivitas antiplasmodium terbaik dengan IC₅₀ sebesar 0,75 µg/mL. Hasil fraksinasi ekstrak eter ini, ditemukan adanya seskuiterpen lakton taginin C yang merupakan komponen aktif yang melawan *Plasmodium*.

Hasil analisis statistik persentase penghambatan (persentase penghambatan ekstrak daun kembang bulan terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei*) dengan menggunakan *oneway Anova* menunjukkan adanya perbedaan antara kelompok profilaksis dengan kelompok perlakuan berbagai stadium infeksi (ringan, sedang dan berat). Hasil analisis selanjutnya dengan menggunakan uji LSD didapatkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok profilaksis dengan kelompok perlakuan berbagai stadium infeksi (ringan, sedang dan berat). Serta antara kelompok perlakuan stadium infeksi ringan dan stadium infeksi sedang dengan kelompok perlakuan stadium infeksi berat. Namun demikian, pada kelompok perlakuan stadium infeksi ringan dengan kelompok stadium infeksi sedang tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kembang bulan mengandung

Research Article

bahan antimalaria yang dapat memberikan efek preventif dan kuratif terhadap infeksi malaria. Namun demikian, pemberian ekstrak etanol daun kembang bulan sebelum terjadi infeksi (sebagai profilaksis) memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan pemberian selama infeksi.

Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun kembang bulan memiliki pengaruh terhadap derajat parasitemia sebelum diinfeksi dan sesudah diinfeksi *Plasmodium berghei* berbagai stadium malaria (ringan, sedang, berat). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa baik ekstrak metanol dan ekstrak air daun kembang bulan mengandung zat antimalaria dengan sifat yang menunjukkan kedua efek preventif dan kuratif pada malaria parasit.¹¹ Namun kemampuan ekstrak etanol daun kembang bulan untuk menghambat pertumbuhan parasit tergantung pada waktu pemberian. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Oyewole *et al*,¹¹ yang membuktikan mencit yang diberi ekstrak methanol dan ekstrak air daun kembang bulan sebelum diinfeksi mempunyai pertumbuhan parasitemia lebih rendah dan kemampuan bertahan hidup (survival) lebih baik dibandingkan kelompok mencit yang diterapi.

SIMPULAN

Ekstrak etanol *Tithonia diversifolia* memiliki aktivitas antimalaria pada mencit Balb/C sebelum diinokulasi *Plasmodium berghei* (profilaksis) dan sebagai antimalaria pada mencit Balb/C yang terinfeksi oleh malaria pada stadium ringan (1%), sedang (5%), dan berat (10%).

DAFTAR PUSTAKA

1. Departemen Kesehatan RI. *Pedoman Penatalaksanaan Kasus Malaria di Indonesia*. Jakarta: Direktorat Jendral Pengendalian Penyakit dan Penyehatan lingkungan. 2006
2. WHO. *Malaria Epidemics / Outbreaks in SEA Region in Malaria*. WHO. Regional Office for South-East Asia. 2007
3. Hendrickse, R.G. *Malaria and Child Health*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 1997. 81:503.
4. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Direktorat Jenderal Pemberantasan Penyakit Menular dan Penyehatan Lingkungan Pemukiman. *Malaria* : Pengobatan no 3. Jakarta. 1991.
5. Tjitra, E. *Obat-obat malaria, Dalam: harijanto PN (editor) Malaria, Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis, & Penanganan*. Jakarta: Penerbit Buku Kedoktean EGC. 2000. 194-223
6. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Direktorat Jenderal Pemberantasan Penyakit Menular dan Penyehatan Lingkungan Pemukiman. *Test Resistensi Untuk Malaria falciparum*. 1995. Jakarta 1995.
7. Syarif, R. A., Wahyuningsih, M. S. A., Ngatidjan, M., Kurniawan, H., dan Hilal, S. R. A. *Aktivitas Antiplasmodium In Vitro Ekstrak Kembang Bulan (Tithonia diversifolia (Hemsley) A.Gray)) Terhadap Plasmodium falciparum*. Tesis Penelitian Bagian Farmasi Kedokteran dan Bagian Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. 2006
8. Calzada, J. G., & Ciccio, J. F. *Aislamiento de Tirofundina a partir de Tithonia diversifolia (Hemsl.) Gray*. Rev. Latinoamer. Quim. 1995. 9: 202-203.
9. Rungeler, P., Lyss, G., Castro, V., Mora, G., Pahl, H.L., Merfort, I. Study of three sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* on their anti-inflammatory activity using the transcription factor NF-kappa B and enzyme of the arachidonic acid pathway as target. *Planta med*. 1998. 64 588-593.
10. Budiarti, C. "Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak Etanol Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia*) secara *In Vivo*". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember. 2011

Research Article

11. Oyewole, L. O., Ibadapo, C. A., Moronkola, D. O., Oduola, A. O., Adeoye, G. O., Anyasor, G. N., dan Obansa, J. A. *Anti-malarial and repellent activities of Tithonia diversifolia (Hemsl.) leaf extracts*. Journal of Medicinal Plants Research 2008. Vol. 2 (8), pp. 171-17
12. Basilio, N., Pagani, E., Monti, D., Oliaro, P., dan Taramelli, D. 1998. *A Microtitre-based Method for Measuring the Haem Polymerization Inhibitory Activity (HPIA) of Antimalarial Drugs*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1998. 42: 55-60
13. Afyah R. *Aktivitas antiplasmodium fraksi larut eter ekstrak metanol daun kembang bulan (Tithonia diversifolia (Hemsl.) A.Gray) pada Plasmodium falciparum secara in vitro*. Tesis Penelitian Prodi Kedokteran Dasar dan Biomedis. Universitas Gajah Mada. 2007
14. Goffin, E., Ziemons, E., De Mol, P., Do Ceu De Madureina, dan M., Martins. *In vitro antiplasmodial activity of Tithonia diversifolia and identification of its main active constituent: Tagitinin C*. Planta Med. 2002. 68 (6): 543-545.