



Potensi Ekstrak Daun Sirsak Dalam Menginduksi Apoptosis Sel Kanker Serviks HeLa

Nadya Mirinda Putri¹, Dessy Arisanty², Noza Hilbertina³

¹ S1 Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang, 25163, Indonesia

² Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang, 25163, Indonesia

³ Bagian Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang, 25163, Indonesia

ABSTRACT

Abstrak

Latar Belakang: Kanker serviks merupakan kanker dengan tingkat kematian tertinggi pada wanita di Indonesia. Sebagian besar penderita kanker serviks datang pada stadium lanjut yang menyebabkan pengobatan menjadi kurang optimal sehingga memerlukan penelitian untuk mencari modalitas terapi, termasuk terapi alternatif. Setiap sel kanker mempunyai karakteristik khusus akibat mutasi genetik (*hallmark of cancer*) seperti sel kanker serviks yang memiliki kemampuan untuk menghindari dari apoptosis. Pada penelitian terdahulu, ekstrak daun sirsak berpotensi menginduksi apoptosis pada sel kanker.

Objektif: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak daun sirsak dalam menginduksi apoptosis pada sel kanker serviks HeLa.

Metode: Penelitian *in vitro* ini dilakukan dengan sel kanker serviks HeLa. Sel HeLa yang konfluens diinkubasi selama 24 jam setelah diberi perlakuan ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi IC_{50} 15,8 $\mu\text{g/ml}$. Apoptosis dilihat dengan pewarnaan *Acridine Orange* dan *Propidium Iodide* dan dilihat dibawah mikroskop fluoresens. Analisis data dilakukan menggunakan uji T independen.

Hasil: Persentase apoptosis sel HeLa lebih tinggi pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. ($p < 0,001$)

Kesimpulan: ekstrak daun sirsak dapat menginduksi apoptosis pada sel HeLa.

Kata kunci: Apoptosis, Ekstrak Daun Sirsak, Sel Kanker serviks HeLa.

Abstract

Background: Cervical cancer is a cancer with the highest mortality rate in women in Indonesia. In an advanced stage, the treatments are more complex and have many side effects thus alternative treatment or combination therapy is needed. The soursop leaf extract has been known to have the potential to induce apoptosis in cancer cells.

Objective: This study aim's is to determine the soursop leaf extract potential to induce apoptosis in HeLa cervical cancer cells.

Methods: This study is an *in vitro* experimental study of HeLa cervical cancer cells. The confluence HeLa cells were incubated for 24 hours with the supplementation of the leaf soursop extract with IC_{50} of 15.8 $\mu\text{g/ml}$ concentration. Apoptosis was detected by microscope fluorescence using *Acridine Orange* and *Propidium Iodide* staining method. Data analysis was performed using the Independent Sample T test.

Conclusion: The results showed percentage apoptosis of HeLa cells in treatment group higher than control group. ($p = 0,000$) Based on this result it can be concluded that soursop leaf extract can induce apoptosis in HeLa cells.

Keyword: Apoptosis, Soursop Leaf Extract, Cervical Cancer Cells HeLa

Apa yang sudah diketahui tentang topik ini?

Potensi ekstrak daun sirsak dalam menginduksi apoptosis pada sel kanker.

Apa yang ditambahkan pada studi ini?

Potensi ekstrak daun sirsak dalam menginduksi apoptosis pada sel kanker serviks HeLa.

CORRESPONDING AUTHOR

Phone: +6281363787861

E-mail: dessyarisanty@med.unand.ac.id

ARTICLE INFORMATION

Received: January 29th, 2022

Revised: August 29th, 2022

Available online: September 25th, 2022

Pendahuluan

Kanker serviks merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh keganasan yang terjadi pada serviks atau mulut rahim.¹ Prevalensi kanker serviks di Indonesia berada pada urutan kedua setelah kanker payudara.² Hasil rekapan jumlah pasien dari seluruh rumah sakit di Sumatera Barat pada tahun 2019, terdapat 223 kasus kanker serviks yang terdiagnosis.³ Kanker serviks berada pada urutan pertama sebagai penyebab tingginya mortalitas pada wanita di negara berkembang seperti Indonesia.⁴ Hal ini diduga terjadi karena kurangnya skrining dan deteksi dini serta keterlambatan pasien menyadari penyakitnya sehingga pasien datang ke layanan kesehatan pada stadium lanjut.⁵

Sel HeLa merupakan *continuous cell line* yang berasal dari adenokarsinoma serviks yang ditemukan pada tahun 1951.⁶ Sel kanker serviks HeLa mengekspresikan E6 dan E7 yang akan menghambat kerja p53 dan pRb sehingga siklus sel menjadi tidak terkendali.⁷ Hal ini tidak diikuti dengan perbaikan DNA dan apoptosis sehingga sel abnormal terbentuk secara terus menerus.⁸

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Ani Maryam dkk yang menyatakan bahwa ekstrak etanol daun sirsak berpotensi sebagai agen ko-kemoterapi pada kanker serviks karena dapat menginduksi apoptosis.⁹ Kandungan *acetogenin* pada daun sirsak jika digunakan sebagai agen ko-kemoterapi pada sel kanker dapat mengurangi efek samping yang dirasakan pasien.¹⁰

Annona Muricata Linn (sirsak) termasuk ke dalam keluarga *Annonaceae* yang telah lama dikenal untuk pengobatan tradisional berbagai penyakit, salah satunya yaitu kanker.¹¹ Senyawa *Annonaceous Acetogenin* merupakan kumpulan senyawa aktif yang bersifat sitotoksik terhadap sel kanker.¹² Senyawa *acetogenin* yang sudah teridentifikasi berpotensi sebagai anti kanker yaitu Annonacin, Annomurisin E, Bullatasin, Uvarisin, Longisin, Bullatasinone, Bullatalisinone, Rolliniastatin, Squamosin, Annocatasin A dan B, Muricin M dan N, dan Murisenin.¹³ Kandungan *acetogenin* pada daun sirsak bersifat toksik terhadap sel kanker karena dapat menghambat kompleks mitokondria I (mitokondria NADH: *ubiquinone oksidoreduktase*) sehingga dapat digunakan untuk pengobatan kanker.¹⁴

Sel kanker biasanya mengekspresikan *Nikotinamida Adenina Dinukleotida* (NADH)

secara berlebihan agar dapat menghasilkan *Adenosine Triphosphate* (ATP) yang banyak untuk berproliferasi, kandungan *acetogenin* dapat menghambat kerja enzim NADH sehingga menghambat produksi ATP.¹⁵ Adanya penurunan ATP pada sel kanker, akan mengakibatkan proliferasi terhambat dan menginduksi terjadinya apoptosis pada sel kanker tersebut.¹⁶ Senyawa *acetogenin* bersifat selektif karena hanya akan menghambat sel yang mengekspresikan NADH secara berlebihan sehingga tidak merusak sel-sel normal tubuh.¹⁷

Selain *acetogenin*, daun sirsak juga mengandung senyawa lainnya yang berperan sebagai antioksidan seperti flavonoid, steroid, alkaloid, tanin, dan saponin.¹⁸ Antioksidan adalah senyawa yang struktur molekulnya dapat memberikan satu elektronnya kepada molekul radikal bebas sehingga dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas.¹⁹ Radikal bebas adalah molekul yang memiliki elektron yang tidak berpasangan sehingga dapat menjadi faktor penyebab berbagai macam penyakit seperti kanker.¹⁸ Selain berperan sebagai antioksidan, flavonoid dan saponin juga berpotensi sebagai antikanker karena dapat menginduksi apoptosis.²⁰

Berdasarkan penelitian sebelumnya terhadap daun sirsak, daun binahong, dan daun benalu yang dilakukan oleh Kurniasih dkk, didapatkan hasil bahwa ketiga daun tersebut berpotensi untuk mencegah pertumbuhan sel kanker.²¹ Menurut penelitian yang dilakukan Rosalina dkk menyatakan bahwa daun sirsak mengandung antioksidan berupa alkaloid dan flavonoid yang dapat menghambat perkembangan penyakit akibat radikal bebas seperti kanker.²² Pada penelitian mengidentifikasi dan uji toksisitas ekstrak metanol dari daun tanaman sirsak yang dilakukan oleh Rika Juliani dkk diperoleh bahwa fraksi metanol dari daun sirsak bersifat toksik dan berpotensi sebagai anti kanker.²³ Penelitian lain yang mendukung yaitu penelitian Utari dkk didapatkan hasil bahwa kandungan *acetogenin* pada daun sirsak dapat membunuh berbagai macam jenis sel kanker.²⁴

Penelitian yang dilakukan tahun 2019 oleh Maritha dkk menyatakan bahwa ekstrak daun sirsak bersifat sitotoksik terhadap sel kanker serviks.²⁵ Pada penelitian serupa, didapatkan IC₅₀ daun sirsak terhadap sel HeLa sebesar 77,096 µg/ml.²⁶ Pada penelitian Rachmawati dkk

disebutkan bahwa ekstrak daun sirsak yang ditanam di daerah Malang dapat menginduksi apoptosis pada 24 jam pertama.²⁷ Namun perlu adanya perbandingan terkait kandungan ekstrak daun sirsak yang ditanam di lingkungan berbeda karena perbedaan kadar senyawa metabolit yang dihasilkan berdasarkan faktor lingkungannya.

Untuk menilai potensi dari ekstrak daun sirsak terhadap kematian sel kanker serviks HeLa secara apoptosis. Apoptosis merupakan proses fisiologis normal tubuh berupa proses kematian sel terprogram.²⁸ Pada apoptosis terjadi pemecahan protein yang terlibat dalam transkripsi, replikasi, dan perbaikan *Deoxyribonucleic Acid* (DNA).²⁹

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti tertarik melakukan penelitian mengenai potensi ekstrak daun sirsak yang telah dikembangkan oleh Farmasi Universitas Andalas dalam menginduksi apoptosis pada sel kanker serviks HeLa karena peluang ekstrak daun sirsak dalam menginduksi apoptosis untuk menjadi terapi ko-kemoterapi antikanker.

Metode

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorium dengan studi *in vitro*. Populasi dan sampel dalam penelitian ini adalah sel HeLa yang 80% konfluens, tidak terkontaminasi, tumbuh dan berkembang dengan baik, dan intak. Sel HeLa ditumbuhkan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Univeristas Andalas. Pengambilan sampel dilakukan secara *consecutive sampling*. Jumlah minimal sampel setiap kelompok sebanyak 18 sampel.

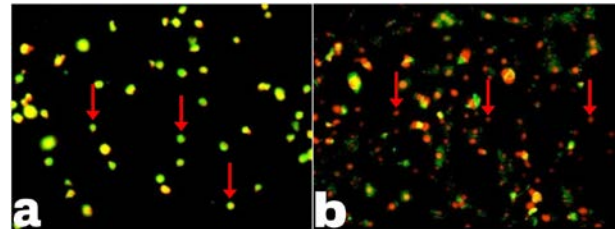
Data hasil penghitungan menggunakan aplikasi *ImageJ* 1.52v yang diperoleh adalah jumlah kanker yang mengalami apoptosis. Data selanjutnya diolah menjadi persentase dan ditampilkan dalam tabel distribusi frekuensi yang selanjutnya dianalisis menggunakan uji T independen. Penelitian ini telah lulus kaji etik oleh Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas dengan nomor surat 393/UN.16.2/KEP-FK/2021.

Hasil

Penelitian ini menggunakan sel kultur kanker serviks HeLa yang dikultur pada *well plate* sebanyak 12 *well* dengan masing-masing 6 *well* untuk kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Setiap *well* akan dibagi menjadi 3 lapang pandang

yang representatif. Kelompok perlakuan yang diberi ekstrak daun sirsak diinkubasi selama 24 jam dengan konsentrasi IC₅₀.

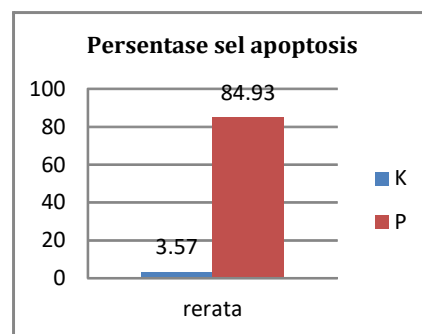
Pengamatan sediaan dilakukan menggunakan mikroskop fluoresens Carl Zeiss yang selanjutnya dihitung menggunakan bantuan aplikasi *ImageJ* 1.52v. Gambaran fluoresens kelompok kontrol dan perlakuan dapat dilihat pada Gambar 5.1.



Gambar 1. Foto mikrograf fluoresens kultur sel kanker serviks HeLa pembesaran 10x dengan pewarnaan Acridine Orange dan Propidium Iodide a) kelompok kontrol (panah pada sel hidup) dan b) kelompok perlakuan IC₅₀ (panah pada sel apoptosis)

Pengamatan sel HeLa yang mengalami apoptosis dilakukan pada bagian yang representatif. Gambar a adalah kelompok kontrol dan gambar b merupakan kelompok perlakuan dengan konsentrasi ekstrak daun sirsak IC₅₀.

Gambar a merupakan kelompok kontrol sel HeLa yang tidak diberikan ekstrak daun sirsak. Pada kelompok ini banyak terdapat sel hidup yang berwarna hijau. Sel yang mati pada kelompok ini lebih sedikit dibandingkan dengan sel hidupnya. Sel yang mengalami apoptosis ditandai dengan sel yang berwarna orange hingga merah dengan sel yang terfragmentasi. Gambar b merupakan kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak daun sirsak dengan IC₅₀. Pada kelompok ini lebih banyak ditemukan sel yang mengalami apoptosis dibandingkan dengan sel yang hidup. Pada penelitian ini, sel yang dinilai adalah sel kanker serviks HeLa yang mengalami apoptosis (Tabel 1).



Gambar 2. Hasil Penghitungan Rata-Rata Sel Yang Mengalami Apoptosis

Pembahasan

Pada penelitian ini terdapat pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap kematian sel kanker serviks HeLa. Hal ini berdasarkan peningkatan persentase sel yang mengalami apoptosis pada kultur sel yang diberi ekstrak daun sirsak dibandingkan dengan yang tidak diberi ekstrak daun sirsak. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Yuniarti dkk yang dilakukan di *Biological Science Center* Institut Teknologi Bandung dengan metode *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling* (TUNEL). Hasil penelitian menyatakan bahwa ekstrak etanol daun sirsak yang didapatkan di daerah Bandung dengan konsentrasi IC₅₀ 120 µg/ml dapat meningkatkan persentase apoptosis dari kultur sel HeLa. Rata-rata persentase sel HeLa yang mengalami apoptosis dengan IC₅₀ adalah 91,09%.³⁰

Pada penelitian lainnya dengan metode *flowcytometry Annexin V Biotin Kit Apoptosis Detection* juga menyebutkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak yang berasal dari daerah Malang terbukti menghambat pertumbuhan sel HeLa dan menginduksi apoptosis sesuai dengan dosis pemberian dan lama pemaparan. Nilai IC₅₀ dari penelitian ini adalah 111,75 µg/ml. Persentase apoptosis pada 24 jam sebanyak 15,71% dan pada 48 jam sebanyak 37,89%.²⁷

Perbedaan konsentrasi ekstrak daun sirsak dipengaruhi oleh kadar senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai obat antikanker dengan cara menginduksi apoptosis.³¹ Metabolit sekunder adalah senyawa non vital yang dihasilkan pada kondisi terancam. Metabolit sekunder digunakan oleh tanaman untuk bertahan dari ancaman biotik maupun abiotik. Ancaman biotik dapat berupa serangga, patogen, hewan herbivora, dan hewan pengerat. Sedangkan ancaman abiotik yang dapat mempengaruhi metabolit sekunder terdiri dari suhu, air, salinitas, ancaman kimiawi, dan ancaman mekanis.³² Senyawa metabolit sekunder bagi organisme lain dapat menjadi zat yang membahayakan atau zat yang bermanfaat. Bagi manusia, senyawa metabolit sekunder telah banyak dikembangkan dan digunakan salah satunya sebagai obat.³¹

Senyawa metabolit sekunder dari ekstrak daun sirsak yang berpotensi sebagai antikanker karena dapat menginduksi apoptosis yaitu *acetogenin*, flavonoid, dan saponin.³⁰ *Acetogenin* (C₃₅H₆₃O₇) merupakan kumpulan senyawa aktif yang bersifat

sitotoksik didalam tubuh dan bekerja dengan menghambat fungsi mitokondria. *Acetogenin* memiliki 350 senyawa turunan yang ditemukan pada keluarga *Annonaceae* dan sebanyak 82 senyawa ditemukan didalam tanaman sirsak. Beberapa contoh turunan dari senyawa *acetogenin* yaitu *annopentocin-A*, *muricatocins A*, *muricatocins B*, *annonacin A*, *trans-isoannonacin*, *annonacin-10-one*, dan *muricatocin*. Dalam menginduksi apoptosis, *acetogenin* bekerja dengan cara menghambat kerja kompleks I mitokondria (*NADH dehidrogenase*) sehingga sel kanker akan kekurangan energi untuk berkembang.¹² Pada penelitian lainnya, *acetogenin* terbukti mampu menginduksi terjadinya apoptosis dan menurunkan proliferasi sel kanker serviks HeLa dengan cara menstabilisasi dan aktivasi p53.³³

Kandungan ekstrak daun sirsak lainnya yang dapat menginduksi apoptosis yaitu flavonoid dan saponin. Flavonoid dapat menginduksi apoptosis dengan beberapa mekanisme, yaitu penurunan ekspresi gen Bcl-2 dan Bcl-x, peningkatan ekspresi gen Bax dan Bak, penghambatan aktivitas DNA topoisomerase I/II, aktivasi endonuklease, dan modulasi *signaling pathways*. Sedangkan saponin dapat memicu apoptosis dengan dua jalur yaitu jalur instrinsik dan ekstrinsik. Induksi apoptosis melalui jalur instrinsik dilakukan dengan depolimerisasi membran mitokondria, stimulasi p53, penurunan ekspresi Bcl-2, dan pelepasan sitokrom-c. Sedangkan jalur ekstrinsik dapat menginduksi apoptosis melalui aktivasi reseptor khusus yang distimulasi oleh ligan pro-apoptosis.²⁰

Ketiga senyawa hasil metabolit sekunder ekstrak daun sirsak dapat berpotensi sebagai terapi kombinasi ataupun sebagai pengobatan alternatif. Berdasarkan penelitian efek ekstrak etanolik daun sirsak terhadap aktivasi sitotoksik doksorubisin pada sel kanker serviks HeLa, didapatkan hasil jika kombinasi ekstrak daun sirsak yang mengandung *acetogenin* dengan agen kemoterapi doksorubisin berpotensi sebagai agen ko-kemoterapi pada kanker serviks.⁹ Pada penelitian lainnya, penggunaan kombinasi *acetogenin* dalam terapi kanker dapat mengurangi efek samping dari agen kemoterapi, melindungi sistem kekebalan tubuh, dan mencegah terjadi infeksi. Hal ini akan mengakibatkan penderita kanker yang menjalani terapi akan merasa lebih

kuat, sehat, dan secara penampilan fisik lebih baik.²⁴ Ekstrak daun sirsak dapat berperan sebagai kemopreventif, antiproliferasi, dan menginduksi apoptosis.¹⁷

Induksi apoptosis merupakan pendekatan baru dan penting dalam eliminasi sel kanker pada tubuh.³⁴ Induksi apoptosis sel kanker adalah suatu proses eliminasi sel kanker selektif yang tidak menimbulkan reaksi inflamasi.³⁵ Dalam penggunaan zat bioaktif turunan tanaman untuk pengobatan kanker, induksi apoptosis dapat digunakan sebagai indikator penilaian respon tubuh terhadap pengobatan.³⁴ Sel kanker memiliki karakteristik yaitu mampu menghindari terjadinya apoptosis.³³ Pengobatan dengan metode induksi apoptosis dapat memperbaiki jalur apoptosis menjadi normal sehingga dapat menghambat perkembangan sel kanker.³⁵

Pada penelitian ini dilakukan *double staining* untuk melihat sel yang hidup dan sel yang mengalami apoptosis. Pewarnaan yang digunakan yaitu *Acridine Orange* dan *Propidium Iodide*. Pewarnaan dengan agen fluorochrome *Acridine Orange* berikatan dengan semua asam nukleat. Agen fluorochrome ini dapat menembus membran sel dan akan menghasilkan warna hijau jika mengikat DNA untai ganda. Sedangkan jika mengikat DNA untai tunggal akan berwarna orange hingga merah.³⁶

Agen fluorochrome lainnya yang digunakan yaitu *Propidium Iodide*. *Propidium Iodide* digunakan sebagai penanda untuk membedakan sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis karena hanya dapat mewarnai sel yang mengalami disintegrasi.³⁷ *Propidium Iodide* akan memberikan warna orange hingga merah saat berikatan dengan asam nukleat.³⁶ Pewarnaan dengan *Propidium Iodide* juga dapat mewarnai sel yang mengalami membran *blebbing* yang merupakan tahap awal dari apoptosis.³⁸ Hal ini sesuai dengan penelitian aktivitas penghambatan proliferasi sel kanker serviks oleh fraksi heksana biji kecipir yang dilakukan oleh Dewi.³⁹

Simpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun sirsak terhadap sel kultur HeLa dapat meningkatkan persentase sel kanker serviks HeLa yang mengalami apoptosis.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih peneliti sampaikan kepada semua pihak yang membantu menyelesaikan dan menyempurnakan penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Listyowati Y, Nurkhasanah N. Efek Sitotoksik dan Pemacuan Apoptosis Fraksi Etroleum Eter Ekstrak Etanol Daun Tapak Lim (*Elephantopus scaber* Linn) Terhadap Sel HeLa. *Pharmaciana*. 2013;3(2). doi:10.12928/pharmaciana.v3i2.424
2. ICO. Human Papillomavirus and Related Diseases Report Indonesia. 2021;
3. Erlinda A rahayu, Nursal DGA, Markolinda Y. Faktor-Faktor yang Berhubungan dengan Deteksi Dini kanker Serviks Metode IVA di Puskesmas Pauh Kamar Tahun 2020 [skripsi]. Padang: Universitas Andalas. 2020.
4. Sinaga DM, Santosa H, Lubis N. Pengalaman Pasien Kanker Serviks Dalam Mengatasi Kecemasan. *J Ilm PANNMED (Pharmacist, Anal Nurse, Nutr Midwivery, Environ Dent*. 2020;15(1):41–5. doi:10.36911/pannmed.v15i1.647
5. Juanda D, Kesuma H. Pemeriksaan Metode IVA (Inspeksi Visual Asam Asetat) untuk Pencegahan Kanker Serviks. *J Kedokt dan Kesehat*. 2015;2(2): 169–74.
6. Huzeiry A. Uji Sitotoksisitas Fraksi Etil Asetat Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia* L.) terhadap Sel Kanker Serviks (Sel HeLa) dengan Metode MTT Assay. 2020;6–33.
7. Evriarti PR, Yasmon A. Patogenesis Human Papillomavirus (HPV) pada Kanker Serviks. *J Biotek Medisiana Indones*. 2019;8(1):23–32. doi: 10.22435/jbmi.v8i1.2580
8. Noor R, Astuti I, Mustofa . Cytotoxicity of α -terpineol in HeLa cell line and its effects to apoptosis and cell cycle. *J thee Med Sci (Berkala Ilmu Kedokteran)*. 2014;46(01):1–9. doi: 10.19106/JMedScie004601201401
9. Maryam A, Arifin I. Efek Ekstrak Etanolik Daun Sirsak (*Annona Muricata* L.) terhadap Aktivitas Sitotoksik Doksorubisin pada Sel Kanker Serviks HeLa [skripsi]. Semarang: Universitas Wahid Hasyim. 2017.
10. Astuti SD, Muslim AB, Indarto. Pengaruh Penambahan Bubuk Kayu Manis Terhadap Aktivitas Antioksidan Teh Daun Sirsak [skripsi]. Lampung: UIN Raden Intan Lampung. 2020;
11. Umar S, Syed F, Romli MF, Hamid M, Alitheen NB. Anti-cancer effect of *Annona Muricata* Linn Leaves Crude Extract (AMCE) on breast cancer cell line. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16(1):311. doi: 10.1186/s12906-016-1290-y.
12. Husnayain KI, Sukohar A, Susantiningsih T. The Utilization of Ethanol Extract of The Soursop Leaves (*Annona Muricata* L.) as Breast Cancer Chemopreventive. *J Agromed Unila*. 2014;1(1):72–6.
13. Rasyidah, Hutasuhut MA. Studi Etnobotani dan Aktivitas Farmakologi Ekstrak Daun Sirsak (*Annona Muricata* L.). *Definitions*. 2020;3(2):10–4.
14. Moghadamtousi SZ, Fadaeinasab M, Nikzad S, Mohan G, Ali HM, Kadir HA. *Annona muricata* (Annonaceae): A review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *Int J Mol Sci*.

- 2015;16(7):15625–58. doi: 10.3390/ijms160715625
15. Jacobo-Herrera N, Pérez-Plasencia C, Castro-Torres VA, Martínez-Vázquez M, González-Esquinca AR, Zentella-Dehesa A. Selective Acetogenins and Their Potential as Anticancer Agents. *Front Pharmacol*. 2019;10:1–12. doi: 10.3389/fphar.2019.00783
 16. Fatmawati D, Yusuf I, Biologi B, Islam U, Agung S. Selektivitas Antikanker Ekstrak Daun Sirsak (*Annona Muricata*) Pada Lini Sel Kanker Payudara. *Bio-site*. 2018;04(2):21–40. doi: 10.22437/bs.v4i2.5440
 17. Lienggonegoro LA. Soursop leaf (*Annona muricata*) and it is potential as an anti-cancer. *Badan Litbang Kesehat*. 2020;6(1):653–7. doi: 10.13057/psnmbi/m060128
 18. Budiarti A, Ulfah M, Oktania FA. Aktivitas Antioksidan Fraksi Kloroform Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) dan Identifikasi Kandungan Senyawa Kimianya. *Pros SNST ke-5 Fak Tek Univ Wahid Hasyim Semarang*. 2016;7–12.
 19. Puspitasari ML, Wulansari TV, Widyaningsih TD, Maligan JM, Nugrahini NIP. Aktivitas Antioksidan Suplemen Herbal Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) dan Kulit Manggis (*Garcinia mangostana* L.). *J Pangan dan Agroindustri*. 2015;4(1):283–90.
 20. Purnamasari M. Efek Ekstrak Metanol Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) Terhadap Induksi Apoptosis Sel Kanker WiDr. *J Univ Muhammadiyah Surakarta*. 2019;
 21. Kurniasih N, Kusmiyati M, Nurhasanah, Sari RP, Wafdan R. Potensi Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn), Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis), dan Daun Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*) Sebagai Antioksidan Pencegah Kanker. *J Edisis*. 2015;IX(1):162–84.
 22. Y R, Adang B. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Daun Sirsak (*Annona Muricata* L) dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrylhidrazyl (DPPH). *Indones J Appl Sci*. 2018;2:567–74. doi: 10.35726/jp.v23i1.299
 23. Juliani R, Yuharmen, Teruna HY. Identifikasi dan Uji toksisitas Ekstrak Metanol dari Daun Tanaman Sirsak (*Annona Muricata* L). *J online Mhs Fak Mat dan Ilmu Pengetah Alam Univ Riau*. 2014;1–6.
 24. Utari. EN tri, A. IS, , Rafi ka Sari. WAK, Harti A. Kegunaan Daun Sirsak (*Annona Muricata* L) untuk Membunuh Sel Kanker dan Pengganti Kemoterapi. *KesMaDaSka*. 2013;1–6.
 25. Maritha V, Handoko DE, Ilmu ST, Husada KB, Madiun M, Ilmu ST, et al. Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Daun Sirsak (*Annona mucirata* L.) Terhadap Sel Kanker Serviks. *J Farm Sains dan Prakt*. 2019;5(1):20–6. doi: 10.31603/pharmacy.v5i1.2623
 26. Dewangga VS. Karakterisasi Isolat Aktif Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) dan Uji Sitotoksik Isolat Aktifnya Terhadap Sel HeLa. [tesis]. Semarang: Universitas Negeri Semarang. 2015.
 27. Rachmawati E, Karyono S, Suyuti H. Efek Ekstrak Etanolik Daun Sirsak pada Proliferasi dan Apoptosis Sel HeLa yang Dimediasi oleh p53. *J Kedokt Brawijaya*. 2012;27(1):28–33. doi: 10.21776/ub.jkb.2012.027.01.5
 28. Mishra S, Verma SS, Rai V, Awasthee N, Arya JS. Curcuma raktakanda Induces Apoptosis and Suppresses Migration in Cancer Cells: Role of Reactive Oxygen Species. *Biomolecules*. 2019; 9(4):159. doi: 10.3390/biom9040159.
 29. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Basic Pathology. 9th ed. General and Oral Pathology for the Dental Hygienist. 2013. 29–44 p.
 30. Yuniarti L, Sastramihardja H, Wida P, Tejasari M, Respati T, Hestu E, et al. Soursop Effect in Cervical Cancer Apoptosis Mechanism. Vol. 2, Global Medical and Health Communications. 2014. p. 1–14.
 31. Dwi S, Yusnawan E. Peningkatan Kandungan Metabolit Sekunder Tanaman Aneka Kacang sebagai Respon Cekaman Biotik. *Iptek Tanam Pangan*. 2017;11(2):167–74.
 32. Amallia N, Mas'ud ZA, Ratnadewi D. Production of Secondary Metabolite Compounds of Gotu Kola (*Centella asiatica*) Under Salinity and Drought Stress. *J Jamu Indones*. 2020;5(2):68–75. doi: 10.29244/jji.v5i2.102
 33. Fridiana R, Arifin I. Pengaruh Ekstrak Etanolik Biji Sirsak Terhadap Induksi Apoptosis Sel Kanker Serviks Dengan Metode Flowcytometry. 2018;1–17.
 34. Arisanty D. In Vitro Cytotoxic Study and Detection of Apoptosis on Breast Cancer Cell lines MDA-MB 231 after Exposed to Azadirachta Indica A. Juss (neem) Extract. *J Kesehat Andalas*. 2013;2(2):80. doi: 10.25077/jka.v2i2.125
 35. Noviardi H, Yuningtyas S, Agustin L. Induksi Apoptosis Sel MCF-7 Kanker Payudara Dari Kombinasi Ekstrak Kulit Jengkol (*Archidendron Jiringa*) Dan Daun Petai Cina (*Leucaena leucocephala*). *J Farm Sains dan Prakt*. 2020;6(2): 157–65.
 36. Immanuel H, Setiawati A. Aktivitas Antikanker Ekstrak Etil Asetat Daun Keladi Tikus Terhadap Sel Kanker Kolon WiDr Melalui Penekanan Ekspresi Protein COX-2 [skripsi]. Yogyakarta: Universitas Sanata Dharma. 2016.
 37. Immanuel H, Setiawati A. Prosedur Operasi Baku Uji Apoptosis Dengan Annexin V-PI. 2018;
 38. Meiyanto E, Fitriyani A, Junedi S, Ikawatu M. Prosedur Tetap Pengamatan Apoptosis dengan Metode Double Staining. 2009;1–5.
 39. Dewi MK. Aktivitas Penghambatan Proliferasi Sel Kanker Serviks Oleh Fraksi heksana Biji Kecapir [tesis]. Purwokerto: Universitas Muhammadiyah Purwokerto. 2015.