



Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap Viabilitas HeLa *Cell Line*

Ilham Andhika Zulen¹, Dessy Arisanty², Rahmatini³

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

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

³ Bagian Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang 25163, Indonesia

ABSTRACT

Abstrak

Latar Belakang: Angka kematian kanker serviks di Indonesia sangat tinggi. Kebanyakan pasien datang pada stadium lanjut karena pada tahap awal tidak menimbulkan gejala yang berarti. Kandungan pada daun sirsak berpotensi menghambat viabilitas sel kanker.

Objektif: Penelitian ini memiliki tujuan mengetahui apakah ekstrak daun sirsak mampu menghambat 50% viabilitas HeLa *cell line*.

Metode: Penelitian eksperimental *in vitro* ini menggunakan HeLa *cell line* yang diinkubasi selama 24 jam yang telah diberikan perlakuan ekstrak daun sirsak sesuai dengan kelompok konsentrasi yang telah ditentukan. Uji aktivitas sitotoksik ekstrak daun sirsak dengan etanol 95% sebagai pelarut dilakukan dengan metode MTT (*microtetrazolium*). Pembacaan hasil dilakukan dengan menggunakan *xMark microplate reader*. Persentase viabilitas dapat dihubungkan dengan log konsentrasi dengan menggunakan rumus regresi.

Hasil: Hasil penelitian menunjukkan makin tinggi konsentrasi makin rendah viabilitas sel. Konsentrasi penghambatan 50% viabilitas HeLa *cell line* dengan masa inkubasi selama 24 jam adalah 112,2 µg/ml.

Kesimpulan: Perbedaan konsentrasi ekstrak daun sirsak dapat berpengaruh terhadap viabilitas sel kanker serviks HeLa dengan menghasilkan persentase viabilitas yang berbeda. Nilai penghambatan 50% viabilitas sel HeLa menunjukkan potensi ekstrak daun sirsak sebagai antikanker.

Kata kunci: ekstrak daun sirsak, viabilitas, HeLa *cell line*

Abstract

Background: Cervical cancer mortality rate in Indonesia is high. Most patients come at advanced stage because in early stages it does not cause significant symptoms. Soursop leaves' compounds have the potential to inhibit cancer cells viability.

Objective: This study aims to determine whether soursop leaf extract can inhibit 50% of HeLa *cell line* viability.

Methods: HeLa *cell line* that was incubated for 24 hours after being treated with soursop leaves extract at the determined concentration. Soursop leaves extract's cytotoxicity were tested using MTT (*microtetrazolium*) method with 95% ethanol as solvent. Then the results were read using an *xMark microplate*

reader. Viability percentage can be related to the log concentration of extract by using regression formula.

Results: The results showed a decrease in viability along with the increase in the given concentration. The extract concentration that can inhibit 50% of the HeLa *cell line* viability with an incubation period of 24 hours was 112.2 µg/ml.

Conclusion: Different concentrations of soursop leaf extract can affect the viability of HeLa cervical cancer cells by producing different percentages of viability. The value of 50% inhibition of HeLa *cell* viability indicates the potential of soursop leaf extract as an anticancer.

Keyword: soursop leaves extract, viability, HeLa *cell line*

Apa yang sudah diketahui tentang topik ini?

Pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap viabilitas sel kanker.

Apa yang ditambahkan pada studi ini?

Pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap viabilitas HeLa *cell line*.

CORRESPONDING AUTHOR

Phone: +6281363787861

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

ARTICLE INFORMATION

Received: April 23rd, 2022

Revised: January 26th, 2023

Available online: February 8th, 2023

Pendahuluan

Kanker serviks adalah penyakit yang banyak dialami oleh wanita yang ada di Indonesia.^{1,3} Infeksi HPV (*Human Papilloma Virus*) pada wanita umumnya tidak menimbulkan gejala pada lesi prakanker serviks sehingga kebanyakan pasien datang terlambat dalam mengobati kanker serviks karena gejalanya sering muncul ketika stadium lanjut.²

Prevalensi kanker serviks mencapai 27/100.000 penduduk dan angka mortalitas mencapai 15,5/100.000 penduduk pada tahun 2020 di Indonesia. Sekitar 36.633 kasus baru ditemukan setiap tahunnya di Indonesia.³⁷ Berdasarkan data dari Kemenkes (Kementerian Kesehatan), mortalitas akibat kanker serviks mencapai 19,1% pada tahun 2018.⁴ Hasil skrining kanker serviks pada wanita berusia 30-50 tahun pada 2017 di Kota Padang dengan menggunakan metode IVA (Inspeksi Visual Asetat) didapatkan 166/128.909 lesi prakanker serviks dari pemeriksaan tersebut.³⁸

Sel HeLa merupakan sel yang telah terkontaminasi HPV subtype 18 yang berasal dari epitel kanker serviks.⁵ HeLa *cell line* merupakan *cell line* tertua yang telah banyak diteliti dengan berbagai jenis *strain* yang tersebar di dunia.⁶

Sirsak berasal dari keluarga *Annonaceae* dan memiliki banyak manfaat dalam hal terapi, seperti asam urat, sakit kepala, insomnia, dan rematik serta kanker.^{10,11} Berdasarkan analisis fitokimia, tanaman sirsak memiliki aktivitas antioksidan cukup tinggi karena banyak mengandung senyawa bioaktif yang berperan aktif melawan berbagai jenis penyakit mulai dari infeksi bakteri hingga kanker.^{11,12} Kandungan senyawa kimia yang dimiliki oleh suatu tanaman bisa berbeda di setiap wilayah karena dapat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan tempat tanaman tersebut tumbuh.¹³

Tanaman sirsak memiliki lebih dari empat puluh senyawa bioaktif asetogenin pada batang, daun, dan bijinya.¹⁴ Senyawa asetogenin dari golongan alkaloid terdapat paling banyak pada daun sirsak.^{15,16} Asetogenin dinilai mampu membunuh sel kanker, bahkan sel kanker yang telah mengalami MDR (*Multi Drug Resistant*).¹⁶ Asetogenin tersebut selektif dalam membunuh sel yang menghasilkan ATP (*Adenosine Triphosphate*) secara berlebihan, seperti sel kanker.^{16,17}

Berdasarkan penelitian mengenai potensi ekstrak daun sirsak, daun benalu, dan daun binahong dengan DPPH (*2,2-Diphenyl-1-Picryl-Hydrazyl-Hydrate*), didapatkan bahwa ketiga daun ini memiliki potensi antioksidan terhadap sel kanker.¹⁸ Menurut penelitian yang telah dilakukan mengenai aktivitas antioksidan dan analisis profil fitokimia daun sirsak dengan DPPH, daun sirsak mengandung flavonoid dan alkaloid sebagai antioksidan pada daun sirsak.⁷

Menurut penelitian sebelumnya mengenai perlakuan ekstrak etanol daun sirsak pada viabilitas T47D *cell line* dengan MTT (*Microtetrazolium*), didapatkan nilai IC₅₀ (*inhibition concentration 50%*) sebesar 94,26 µg/ml setelah diinkubasi selama 72 jam. Nilai ini menunjukkan daun sirsak berpotensi sebagai antikanker.¹⁹ Hasil penelitian mengenai efektivitas ekstrak etanol daun sirsak dengan MTT pada sel MCF-7 ialah nilai IC₅₀ 117,87 µg/ml yang menunjukkan bahwa ekstrak tersebut berpotensi menghambat viabilitas sel kanker ini.²⁰ Menurut penelitian sebelumnya mengenai aktivitas sitotoksik dari ekstrak etanol daun sirsak menggunakan MTT pada sel HeLa didapatkan nilai IC₅₀ dari ekstrak tersebut adalah 337 µg/ml. Hasil ini menunjukkan ekstrak daun sirsak dinilai mempunyai potensi aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker serviks.¹⁷

Berdasarkan uraian di atas tentang potensi efek antikanker daun sirsak dan masih tingginya angka kematian akibat kanker serviks maka peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang "Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap Viabilitas HeLa *Cell Line*".

Metode

Penelitian ini berjenis eksperimental laboratorium *in vitro*. Penelitian berlokasi di Laboratorium Biomedik Universitas Andalas mulai dari Desember 2021 hingga April 2022.

Penelitian ini menggunakan ekstrak daun sirsak yang telah dibuat oleh Pertiwi Wiwi pada tahun 2020.¹⁹ Ekstrak daun sirsak tersebut disimpan pada kulkas dengan suhu 4°C. Penelitian ini menggunakan sel HeLa 80% konfluens yang berkembang dan tumbuh dengan baik, tidak terkontaminasi, intak. Sel HeLa ditumbuhkan di *plate* yang berlokasi di Laboratorium Kultur Sel

Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. HeLa *cell line* akan dikultur dan diberikan perlakuan ekstrak daun sirsak dengan parameter yang berbeda. Pembacaan hasil absorbansi dilakukan dengan *xMark microplate reader*.

Kelompok konsentrasi yang digunakan adalah konsentrasi ekstrak 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml, kelompok kontrol, dan kontrol media. Penelitian ini telah lulus kaji etik oleh Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas dengan nomor surat 642/UN.16.2/KEP-FK/2022.

Persentase sel hidup memperlihatkan pengaruh ekstrak daun sirsak pada viabilitas HeLa *cell line* melalui hasil absorbansi, lalu tentukan nilai IC₅₀ dengan dengan rumus regresi ($y = a + bx$). Cara perhitungannya adalah lihat hasil absorbansi untuk menentukan persentase sel hidup, selanjutnya grafik konsentrasi dan persentase viabilitas dibuat dengan *chart type scatter* serta *chart subtype compare pairs of value*, persamaan regresi linier ditentukan melalui *add trendline* pada grafik, lalu masukkan $y = 50\%$ lalu cari x , lalu hitung juga antilog konsentrasi hingga didapatkan terhambatnya 50% viabilitas sel akibat konsentrasi tersebut

Hasil

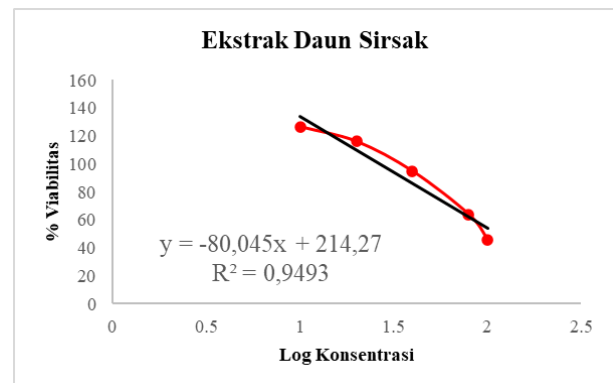
Hasil penelitian mengenai pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap viabilitas HeLa *cell line* dengan masa inkubasi 24 jam adalah:

Tabel 5.1 Hasil Viabilitas Sel Inkubasi 24 Jam

Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi/Perlakuan			Rata-rata Absorban	% Viabilitas Sel
	1	2	3		
10	1,615	1,615	1,698	1,643	126,55
20	1,419	1,597	1,538	1,518	116,09
40	1,298	1,276	1,216	1,263	94,71
80	0,968	0,903	0,812	0,894	64,74
100	0,684	0,694	0,668	0,682	45,91
Kelompok kontrol	1,282	1,339	1,358	1,326	
Media	0,135	0,137	0,133	0,135	

Berdasarkan tabel 5.1, perbedaan persentase viabilitas sel terjadi akibat perbedaan pemberian konsentrasi ekstrak daun sirsak. Persentase viabilitas sel terkecil adalah 45,91% pada konsentrasi ekstrak daun sirsak 100 µg/ml. Konsentrasi 10 µg/ml menghasilkan persentase viabilitas sel yang paling besar, yaitu 126,55%.

Grafik log konsentrasi dapat menghubungkan persentase viabilitas sel dengan konsentrasi ekstrak. Nilai IC₅₀ dapat ditentukan menggunakan persamaan regresi.



Gambar 5.1 Hubungan Persentase Viabilitas Sel dengan Konsentrasi Ekstrak dengan Masa Inkubasi 24 Jam

Berdasarkan gambar 5.1, persamaan regresi $y = a + bx$ memiliki nilai a yaitu 214,27 dan nilai b yaitu -80,045. Jika nilai y diganti dengan 50% pada persamaan regresi $y = -80,045x + 214,27$, maka nilai x akan didapatkan, yaitu 2,05. Nilai IC₅₀ didapatkan dengan antilog dari nilai x , yaitu 112,2 µg/ml.

Pembahasan

Penelitian ini dilakukan dengan metode MTT yang memiliki tujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap viabilitas HeLa *cell line*. Konsentrasi ekstrak yang meningkat menyebabkan turunnya persentase viabilitas sel menunjukkan bahwa ekstrak ini memengaruhi viabilitas HeLa *cell line*.

Penelitian ini menggunakan kultur HeLa *cell line in vitro*. Kultur sel membutuhkan lingkungan buatan yang sesuai seperti *flask* yang sesuai dan media sebagai nutrisi sel, contohnya karbohidrat, mineral, vitamin, asam amino, faktor pertumbuhan, hormon, dan gas. Selain media, lingkungan fisika-kimia juga perlu diatur, seperti pengaturan suhu, tekanan osmotik, dan pH.⁵⁰ Penelitian ini menggunakan media RPMI. Terkandung banyak fosfat pada media ini untuk pertumbuhan limfoid dalam bentuk bebas serum. Serum ditambahkan pada media untuk memperoleh pertumbuhan dan viabilitas sel yang optimal.⁵¹ Penambahan serum FBS pada penelitian ini dapat memberikan tambahan faktor pertumbuhan dan protein transpor membran,

meningkatkan adhesi sel, dan melindungi sel dari tekanan yang terkait dengan lingkungan *in vitro*.⁵²

Viabilitas sel diukur dengan MTT pada penelitian ini. PBS akan melarutkan garam kuning tetrazolium dan diletakkan pada tiap sumuran. Rantai respirasi mitokondria sel hidup memiliki enzim suksinat reduktase untuk mereduksi garam ini menjadi kristal formazan. Selanjutnya, DMSO diberikan untuk melarutkan kristal formazan agar menghasilkan warna ungu. Hubungan linier terjadi pada jumlah sel yang hidup dengan intensitas warna ungu. Pembacaan nilai absorban dilakukan dengan *xMark microplate reader*. Pemberian konsentrasi ekstrak yang rendah akan menghasilkan persentase viabilitas sel yang tinggi dengan intensitas warna ungu yang meningkat.

Berdasarkan *National Cancer Institute*, terdapat empat kategori komponen aktivitas sitotoksik suatu ekstrak, yaitu nilai $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$ bersifat sangat toksik, nilai IC_{50} 21-200 $\mu\text{g/ml}$ ialah sitotoksik sedang, dan nilai IC_{50} 201-500 $\mu\text{g/ml}$ ialah sitotoksik lemah.⁴⁹ Nilai IC_{50} pada penelitian ini menunjukkan komponen aktivitas sitotoksik sedang pada sel HeLa.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan mengenai aktivitas sitotoksik dari ekstrak etanol daun sirsak menggunakan metode yang sama terhadap sel HeLa, didapatkan nilai IC_{50} 337 $\mu\text{g/ml}$. Penelitian Vevi menggunakan daun sirsak dari Kecamatan Plaosan, Kabupaten Magetan dengan metode pengolahan maserasi.¹⁷ Perbedaan nilai aktivitas penghambatan 50% dapat dipengaruhi oleh tempat tumbuh tanaman tersebut. Hal ini mengakibatkan terjadinya perbedaan kadar senyawa metabolit sekunder pada tanaman tersebut.¹³ Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan mengenai pengaruh perbedaan tempat tumbuh dengan kandungan ekstrak etanol daun sirsak didapatkan bahwa terdapat kadar senyawa yang berbeda pada tempat tumbuh yang berbeda karena dipengaruhi oleh faktor kondisi lingkungan tempat tumbuh tanaman sirsak tersebut.⁵⁵

Metabolit sekunder adalah senyawa nonesensial sebagai pertahanan yang dihasilkan pada saat kondisi suatu tanaman terancam baik dari ancaman biotik maupun abiotik. Ancaman biotik dapat berupa gulma, penyakit, dan hama. Sedangkan ancaman abiotik yang dapat memengaruhi pertumbuhan suatu tanaman adalah air, suhu, radiasi, salinitas, cekaman

mekanis, dan cekaman kimiawi.⁵⁶ Senyawa metabolit sekunder dapat memberikan manfaat antioksidan pada manusia. Selain itu, senyawa ini telah banyak dikembangkan dan digunakan sebagai bahan baku obat.⁵⁷

Daun sirsak memiliki senyawa metabolit sekunder asetogenin dalam menghambat viabilitas HeLa *cell line*. Asetogenin bersifat selektif terhadap sel kanker sehingga dapat menurunkan produksi ATP dengan menghambat kompleks I mitokondria baik pada sel kanker MDR maupun yang tidak, memengaruhi MMP sehingga dapat menginduksi apoptosis, dan menghentikan siklus sel pada fase G1 yang berimplikasi pada viabilitas sel kanker tersebut.^{24,32,33}

Daun sirsak juga mengandung senyawa bioaktif lainnya, seperti senyawa golongan tannin, flavonoid, terpenoid, fenol, steroid, kuinon, dan saponin. Senyawa terpenoid pada daun sirsak dapat menginduksi terjadinya apoptosis.¹² Senyawa fenol, flavonoid, dan tannin pada tanaman sirsak dapat memberikan efek terapeutik karena bersifat antioksidan, antiinflamasi, dan gastroprotektif.²⁶ Penelitian yang telah dilakukan mengenai aktivitas antioksidan dan profil fitokimia dari ekstrak metanol buah sirsak terhadap proliferasi sel limfoma Ramos-1 dengan metode DPPH dan FRAP menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mengandung polifenol, flavonoid, dan tannin memiliki aktivitas antikanker sedang.²⁷

Berdasarkan hasil penelitian ini, hipotesis penelitian diterima karena terbukti ditemukannya pengaruh ekstrak daun sirsak dalam menghambat viabilitas HeLa *cell line*.

Simpulan

Hasil penelitian ini adalah ekstrak daun sirsak dengan perbedaan konsentrasi berpengaruh terhadap viabilitas sel kanker serviks HeLa dengan menghasilkan persentase viabilitas yang berbeda. Nilai penghambatan 50% viabilitas sel HeLa menunjukkan potensi ekstrak daun sirsak sebagai antikanker.

Ucapan Terima Kasih

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

Daftar Pustaka

1. Oktaviani BD, Sriwidayani NP, Sumadi Juli IW. Karakteristik klinikopatologi penderita kanker serviks uteri berdasarkan data di laboratorium patologi anatomi RSUP Sanglah Denpasar tahun 2011-2015. *JMU*. 2018;7(8):1-6.
2. Ananti Y, Sari F. Hubungan sosiodemografi wanita usia subur dengan perilaku deteksi dini kanker serviks metode IVA. *J Kesehat Samodra Ilmu*. 2020;11(1):76-83. doi: 10.55426/jksi.v11i1.17
3. Nita V, Indrayani N. Pendidikan kesehatan dalam upaya pencegahan kanker serviks pada wanita usia subur. *Din J Pengabdian Kpd Masy*. 2020;4(2):306-10. doi: 10.31849/dinamisia.v4i2.4175
4. Yuliasuti LPS, Nudhira U. Hubungan faktor risiko dengan lesi prakanker serviks di Puskesmas Segerongan Lombok Barat. *J Innov Res Knowl*. 2021;1:877-86.
5. Maharani S. Aktivitas sitotoksik ekstrak etil asetat daun mangan terhadap sel HeLa dan sel WiDr (Skripsi). Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta; 2019.
6. Ma'at S. Teknik dasar kultur sel. 1st ed. Surabaya: Pusat Penerbitan dan Percetakan UNAIR (AUP); 2011. 154 p.
7. Kurang RY, Adang B. Skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan daun sirsak dengan metode DPPH. *PARTNER*. 2018;23.
8. Simanjuntak E, Zulham. Superoksida dismutase dan radikal bebas. *J Keperawatan dan Fisioter*. 2020;2: 124-9. doi: 10.35451/jkf.v2i2.342
9. Wahidji NA, Rauf S, Abidin N. Perbandingan kadar antioksidan total pada kanker serviks stadium lanjut sebelum dan setelah kemoterapi. *Indones J Obstet Gynecol Sci*. 2020;134-42. doi: 10.24198/obgynia/v4n2.285
10. Najmudin SUFS, Romli MF, Hamid M, Alitheen NB, Abd Rahman NMA. Anti-cancer effect of *Annona muricata* Linn leaves crude extract on breast cancer cell line. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16:1-20. doi: 10.1186/s12906-016-1290-y.
11. Febrianti DR, Niah R. Analisis kandungan flavonoid dan aktivitas antihiperurisemia ekstrak etanol daun sirsak pada mencit jantan secara in vivo. *J Ilm Ibnu Sina*. 2018;3:304-11. doi: 10.36387/jiis.v3i2.183
12. Iyanda-Joel WO, Ajetunmobi OB, Chinedu SN, Iweala EEJ, Adegbite OS. Phytochemical, antioxidant and mitochondrial permeability transition studies on fruit-skin ethanol extract of *Annona muricata*. *J Toxicol*. 2019;2019:1-9. doi: 10.1155/2019/7607031.
13. Setya A, Pratiwi FD. Aktivitas antioksidan ekstrak bunga telang menggunakan metode DPPH. *J Ilm Kohesi*. 2021;5:149-55.
14. Sun S, Liu J, Sun X, Zhu W, Yang F, Felczak L, et al. Novel Annonaceous acetogenins from graviola fruits with strong anti-proliferative activity. *Tetrahedron Lett*. 2017;58:1895-9. doi: 10.1016/j.tetlet.2017.04.016.
15. Fitri A, Sari Y, Nurjanna A, Astuti. Uji kualitatif dan aktivitas senyawa acetogenin dari ekstrak biji sirsak sebagai insektisida kutu beras. *Media Kesehat Politek Kesehat Makassar*. 2019;53:5. doi: 10.32382/medkes.v14i2.926
16. Rady I, Bloch MB, Chamcheu RCN, Banang Mbeumi S, Anwar MR, Mohamed H, et al. Anticancer properties of graviola: a comprehensive mechanistic review. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:1826170. doi: 10.1155/2018/1826170.
17. Maritha V, Handoko DE. Aktivitas sitotoksik ekstrak daun sirsak terhadap sel kanker servik. *J Farm Sains dan Prakt*. 2019;5:20-6. doi: 10.31603/pharmacy.v5i1.2623
18. Kurniasih N, Kusmiyati M, Nurhasnah, Puspita Sari R, Wafdan R. Potensi daun sirsak, daun binahong, dan daun benalu sebagai antioksidan pencegah kanker. *J Istek*. 2015;9:162-84.
19. Pertiwi W, Arisanty D, Linosefa. Pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap viabilitas cell line kanker payudara T47D secara in vitro. *J Kesehat Andalas*. 2020;9:165-70. doi: 10.25077/jka.v9i1S.1173
20. Ibrahim A, Sandhika W, Budipramana VS. Uji efektifitas ekstrak etanol daun *Annona muricata* terhadap sel kanker payudara MCF-7. *J Manaj Kesehat Yayasan RSDr Soetomo*. 2020;6(1):64. doi: 10.29241/jmk.v6i1.289
21. Febriyanti, Yolanda Y. Pengaruh rebusan daun sirsak terhadap kadar gula darah pada penderita diabetes melitus kerja Puskesmas Sijunjung. *Menara Ilmu*. 2020;14(1): 77-83. doi: 10.31869/mi.v14i1.2120
22. Wahab SMA, Jantan I, Haque MA, Arshad L. Exploring the leaves of *Annona muricata* L. as a source of potential anti-inflammatory and anticancer agents. *Front Pharmacol*. 2018;9:1-20. doi: 10.3389/fphar.2018.00661.
23. Apriliana E, Syafira AU. Ekstraksi daun sirsak sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes*. *Majority*. 2016;5:1-5.
24. Megawati L. Uji aktivitas antikanker ekstrak biji sirsak terhadap beberapa sel kanker manusia secara in vitro (Skripsi). Surabaya: Universitas Airlangga; 2014.
25. Carmona APB, Beltran NPS, Ruiz J-CG, Ruiz-Cruz S, Quiroz CC, Palacio EFM. Antiviral, antioxidant, and antihemolytic effect of *Annona muricata* L. leaves extracts. *Plants Basel*. 2020;9(12):1650. doi: 10.3390/plants9121650.
26. Mutakin M, Fauziati R, Fadhilah FN, Zuhrotun A, Amalia R, Hadisaputri YE. Pharmacological activities of soursop. *Molecules*. 2022;27:1-17. doi: 10.3390/molecules27041201
27. Al-Shaya HM, Li H, Beg OU, Hamama AA, Witiak SM, Kaseloo P, et al. Phytochemical profile and antioxidation activity of annona fruit and its effect on lymphoma cell proliferation. *Food Sci Nutr*. 2020;8(1): 58-68. doi: 10.1002/fsn3.1228
28. Rukmana H. Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan fraksi n-heksana serta etil asetat daun sirsak dengan metode 1,1 Difenil 2 Pikrilhidrazil (Skripsi). Medan: Universitas Sumatera Utara; 2019.
29. Agung Dhimasena Widyananda G, Nova Mahendra A, Made Jawi I. Efek antibakteri ekstrak etanol daun sirsak muda dan tua terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. *Intisari Sains Medis*. 2021;12: 212-8. doi: 10.15562/ism.v12i1.915.
30. Justino AB, Florentino RM, França A, Filho ACML, Franco RR, Saraiva AL, et al. Alkaloid and acetogenin-rich fraction from *Annona crassiflora* fruit peel inhibits proliferation and migration of human liver cancer HepG2 cells. *PLoS One*. 2021;16(7):e0250394. doi: 10.1371/journal.pone.0250394.
31. Suryawinata A, Sukohar A. Potensi Annonaceous acetogenins dari sirsak sebagai agen kemoterapi melalui induksi apoptosis dan inhibisi HIF-1. *Medical Journal of Lampung University*. 2016;5(5):97-101.
32. 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
33. Widyastuti DA, Nurdyansyah F. Ekstrak sirsak untuk terapi kanker. *Ilmu Pangan dan Has Pertan*. 2018;2(2). doi: 10.26877/jiphp.v2i2.3211
 34. Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Weil PA. Biokimia Harper. 30th ed. Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2018. 1–820 p.
 35. Azizah MN, Rahayu DA, Hidayati E. Tingkat depresi pasien kanker yang akan menjalani kemoterapi di RSI Sultan Agung Semarang (Skripsi). Semarang: Universitas Muhammadiyah Semarang; 2017.
 36. Nasional KPK, RI K. Kanker serviks. In: Panduan Penatalaksanaan Kanker Serviks. 2017. p. 1–36.
 37. Bruni L, Albero G, Serrano B, Mena M, Collado JJ, Gómez D, et al. Human papillomavirus and related diseases report. ICO/IARC HPV Inf Cent HPV Cancer. 2021;
 38. Hidayat AN, Ariani N, Burhan IR. Gambaran faktor risiko pasien kanker serviks di RSUP Dr. M. Djamil Padang tahun 2019. *JIKESI*. 2021;1:425–30. doi: 10.25077/jikesi.v1i3.239
 39. Pangribo S. Beban kanker di Indonesia. Pus Data Dan Inf Kesehat Kementerian Kesehat RI. 2019;1–16.
 40. Indonesia PDSPD. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. 6th ed. Setiati S, Idrus A, Sudoyo AW, K. MS, Setiyohadi B, Syam AF, editors. Jakarta: InternaPublishing; 2014. 3052–3063 p.
 41. Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, Kaur G. Key molecular events in cervical cancer development. *Medicina (B Aires)*. 2019; 55(7):384. doi: 10.3390/medicina55070384..
 42. Prawirohardjo S. Ilmu Kandungan. 3rd ed. Mochamad A, Baziad A, Prabowo P, editors. Jakarta: PT Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo; 2011. 294–299 p.
 43. Merz J, Bossart M, Bamberg F, Eisenblaetter M. Revised FIGO staging for cervical cancer. *RoFo*. 2020; 192(10):937–44. doi: 10.1055/a-1198-5729.
 44. Robinson PK. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem*. 2015; 59:1–41. doi: 10.1042/bse0590001.
 45. Wahjuni S. Metabolisme biokimia. 1st ed. Atmaja J, editor. Vol. 53, Journal of Chemical Information and Modeling. Denpasar: Udayana University Press; 2013. 21–22 p.
 46. Devi SY, Sukeksi A, Santosa B. Perbedaan kadar glukosa darah pada serum yang dipisah dan tidak dipisah dari endapan (Tesis). Semarang: Universitas Muhammadiyah Semarang; 2018.
 47. Putri YS. Skrining dan uji aktivitas enzim protease bakteri dari limbah rumah pemotongan hewan (Skripsi). Surabaya: Universitas Airlangga. 2012.
 48. Astuti RP, Andri Sukeksi, Harrun Nurachmat. Perbedaan jumlah limfosit sebelum dan sesudah kemoterapi pada penderita ca mammae (Skripsi). Semarang: Universitas Muhammadiyah Semarang; 2017.
 49. Damasuri AR, Sholikhah EN, Mustofa. Cytotoxicity of E-1-4-aminophenyl-3-phenylprop-2-en-1-one on HeLa cell line. *Indones J Pharmacol Ther*. 2020;1:54–9. doi: 10.22146/ijpther.606
 50. Khumairoh I, Puspitasari IM. Kultur sel. *Farmaka*. 2016;14(2):98–110. doi: 10.24198/jf.v14i2.10810
 51. Andiana M, Rachmawati Y, Andayani SS. Kultur sel BHK menggunakan media DMEM. *Biotropic J od Trop Biol*. 2017;3:24–38.
 52. Lehrich BM, Liang Y, Khosravi P, Federoff HJ, Fiandaca MS. Fetal bovine serum-derived extracellular vesicles persist within vesicle-depleted culture media. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(11):3538. doi: 10.3390/ijms19113538..
 53. Prihantini M, Wibowo DN, Azizah N, Setya NF. Formulasi dan uji stabilitas antioksidan krim nanopartikel kitosan-ekstrak etanol daun sirsak menggunakan metode cycling test. *J Cendekia Eksakta*. 2020;88–93. doi: 10.31942/ce.v6i2.5525
 54. Rahmawati DP. Pengaruh waktu dan suhu penyimpanan terhadap aktivitas antioksidan ekstrak daun sembung (Skripsi). Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah Jakarta; 2017.
 55. Setyorini HA, Kurniatri AA, Adelina R, Adelina A. Karakterisasi mutu ekstrak daun sirsak dari tiga tempat tumbuh. *Bul Penelit Kesehat*. 2016;44:279–86.
 56. Amallia N, Alim Z, Ratnadewi D. Produksi senyawa metabolit sekunder tanaman pegagan pada kondisi cekaman salinitas dan kekeringan. *J Jamu Indones*. 2020;5:68–75.
 57. Dwi S, Yusnawan E. Peningkatan kandungan metabolit sekunder tanaman aneka kacang sebagai respon cekaman biotik. *Iptek Tanam Pangan*. 2017;11(2): 167–74.