

**EFEK KOMBINASI EKSTRAK RUMPUT LIDAH ULAR (*Hedyotis diffusa* WILLD.) DAN EKSTRAK SIRSAK (*Annona muricata* LINN.)
TERHADAP VIABILITAS SEL KANKER PAYUDARA MCF-7**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi**



**Oleh:
Billy Kurniawan
NIM 145070500111012**

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**



DAFTAR ISI

Halaman

Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Kata Pengantar	iii
Abstrak	v
Abstract	vi
Daftar Isi	vii
Daftar Gambar	ix
Daftar Tabel	x
Daftar Singkatan	xi
Daftar Lampiran	xii

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	5
1.4. Manfaat Penelitian	5

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kanker Payudara	6
2.1.1. Definisi	6
2.1.2. Patofisiologi	8
2.2. Sel MCF-7	9

2.3. Rumput Lidah Ular (<i>Hedyotis diffusa</i> Willd.).....	10
2.3.1. Taksonomi	10
2.3.2. Deskripsi	11
2.3.3. Kandungan Fitokimia	11
2.3.3. Aktivitas Antikanker.....	12
2.4. Sirsak (<i>Annona muricata</i> Linn.).....	13
2.4.1. Taksonomi	13
2.4.2. Deskripsi	13
2.4.3. Kandungan Fitokimia	14
2.4.3. Aktivitas Antikanker.....	14

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konsep Penelitian.....	15
3.2. Hipotesis Penelitian	18

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian.....	19
4.2. Subjek Penelitian	19
4.3. Variabel Penelitian.....	19
4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian.....	20
4.5. Bahan dan Alat Penelitian.....	20
4.5.1. Ekstraksi Herba Rumput Lidah Ular dan Ekstrak Daun Sirsak .	20
4.5.2. Kultur Sel MCF-7	20
4.5.3. Pemaparan Ekstrak pada Kultur Sel	21
4.5.4. Penentuan IC ₅₀ menggunakan Uji MTT	21

4.5.5. Uji Sitotoksik Kombinasi Kemoterapi.....	21
4.6. Definisi Istilah/Operasional	21
4.7. Prosedur Penelitian	23
4.7.1. Skema Prosedur Penelitian.....	23
4.7.2. Ekstraksi Herba Rumput Lidah Ular dan Daun Sirsak	24
4.7.3. Kultur Sel MCF-7	25
4.7.4. Penentuan IC50 menggunakan Uji MTT	35
4.7.5 Uji Sitotoksik Kombinasi Kemoterapi	36

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1. Hasil Determinasi <i>Hedyotis diffusa</i> Willd. dan <i>Annona muricata</i> Linn.	42
5.2. Hasil Ekstraksi <i>Hedyotis diffusa</i> Willd. dan <i>Annona muricata</i> Linn.	42
5.3. Hasil Uji Sitotoksik Tunggal.....	43
5.4. Hasil Uji Sitotoksik Kombinasi.....	48

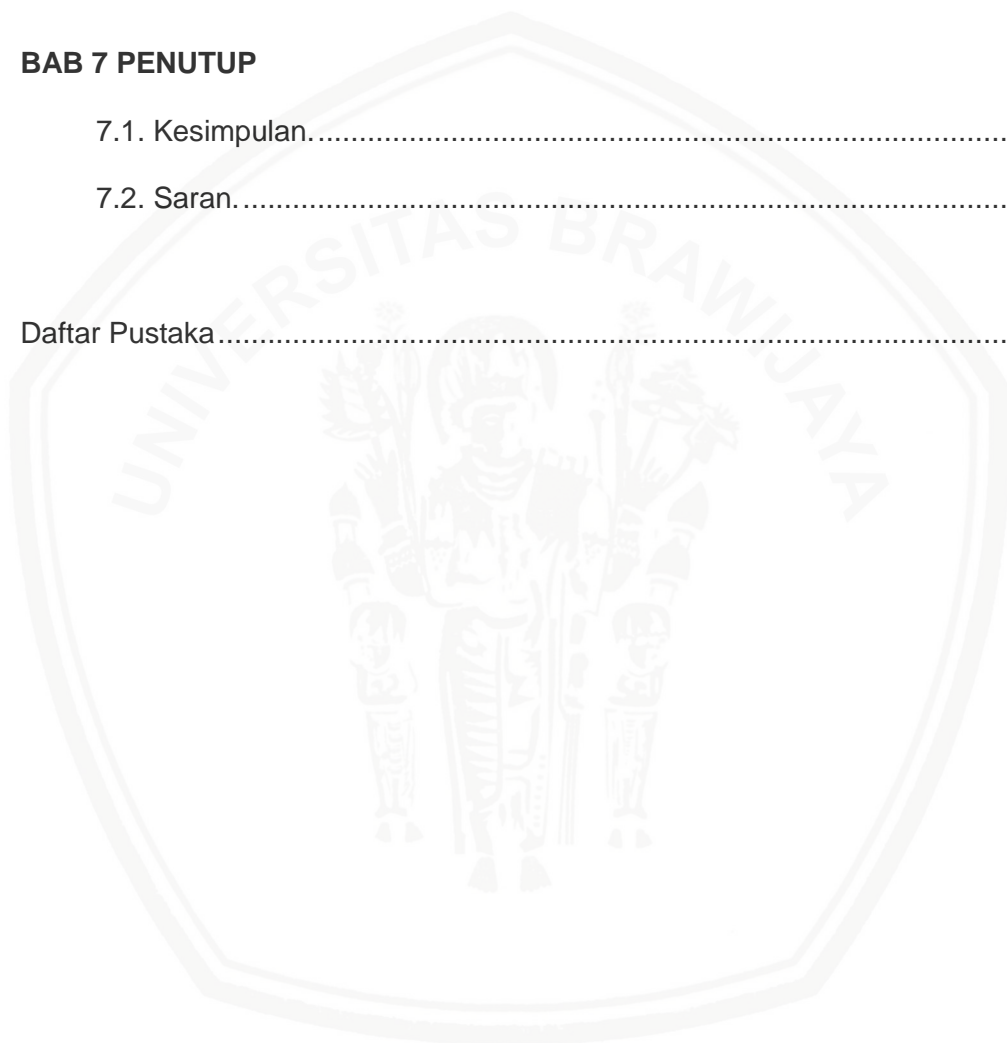
BAB 6 PEMBAHASAN

6.1. Pembahasan Hasil Penelitian.	50
6.1.1. Ekstraksi <i>Hedyotis diffusa</i> Willd. dan <i>Annona muricata</i> Linn. ...	50
6.1.2. Uji Sitotoksik Tunggal Ekstrak <i>Hedyotis diffusa</i> Willd. dan <i>Annona muricata</i> Linn.....	50
6.1.3. Pengaruh Pemberian Ekstrak <i>Hedyotis diffusa</i> Willd. Terhadap Viabilitas Sel	51
6.1.4. Pengaruh Pemberian Ekstrak <i>Annona muricata</i> Linn. Terhadap Viabilitas Sel	51

6.1.5. Efek Kombinasi Ekstrak <i>Hedyotis diffusa</i> Willd. dan <i>Annona muricata</i> Linn Terhadap Viabilitas Sel.....	52
6.2. Implikasi Terhadap Bidang Kefarmasian.....	53
6.3. Keterbatasan Penelitian.....	53

BAB 7 PENUTUP

7.1. Kesimpulan.....	54
7.2. Saran.....	54
Daftar Pustaka.....	55



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Sel MCF-7 Normal	8
Gambar 2.2 <i>Hedyotis diffusa</i> Willd.	10
Gambar 2.3 <i>Annona muricata</i> Linn	13
Gambar 3.1 Kerangka Konsep.....	15
Gambar 4.1 Alur Penelitian.....	23
Gambar 5.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Hedyotis Herba terhadap Viabilitas Sel MCF-7	45
Gambar 5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Hedyotis Herba terhadap Viabilitas Sel MCF-7	47

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 4.1. Interpretasi Nilai CI.....	41
Tabel 5.1. Hasil CI Kombinasi Ekstrak HD-AM	49



DAFTAR SINGKATAN

ANOVA	<i>Analysis Of Variance</i>		
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>		
BMM	Balai Materia Medika		
BRCA	<i>Breast Cancer Associated Gene</i>		
CI	<i>Combination Index</i>		
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i>		
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>		
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>		
IC ₅₀	<i>Inhibitory Concentration 50%</i>		
LAF	<i>Laminar Air Flow</i>		
MK	Media Kultur		
MTT	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-II]-2,5	Difenil	Tetrazolium
	Bromida		
PBS	<i>Phospate Buffer Saline</i>		
RPMI	<i>Ros Park Memorial Institute</i>		
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>		
WHO	<i>World</i>	<i>Health</i>	<i>Organizatio</i>

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Surat Kelaikan Etik.....	59
Lampiran 2. Product Sheet Sel MCF-7 HTB-22	60
Lampiran 3. Determinasi tanaman HD	63
Lampiran 4. Determinasi tanaman AM.....	64
Lampiran 5. Hasil Rendemen Ekstrak HD dan AM.....	65
Lampiran 6. Perhitungan Preparasi Ekstrak HD Uji Sitotoksik Tunggal.....	66
Lampiran 7. Perhitungan Preparasi Ekstrak AM Uji Sitotoksik Tunggal.....	69
Lampiran 8. Perhitungan Preparasi Uji Sitotoksik Kombinasi HD-AM	71
Lampiran 9. Hasil Perhitungan Persentase Viabilitas Sel dan Perhitungan IC ₅₀ Ekstrak HD (Replikasi 1)	72
Lampiran 10. Hasil Perhitungan Persentase Viabilitas Sel dan Perhitungan IC ₅₀ Ekstrak HD (Replikasi 2).....	73
Lampiran 11. Hasil Perhitungan Persentase Viabilitas Sel dan Perhitungan IC ₅₀ Ekstrak HD (Replikasi 3).	74
Lampiran 12. Hasil Perhitungan Persentase Viabilitas Sel dan Perhitungan IC ₅₀ Ekstrak AM (Replikasi 1)	75
Lampiran 13. Hasil Perhitungan Persentase Viabilitas Sel dan Perhitungan IC ₅₀ Ekstrak AM (Replikasi 2).....	76
Lampiran 14. Hasil Perhitungan Persentase Viabilitas Sel dan Perhitungan IC ₅₀ Ekstrak AM (Replikasi 3)	77



Lampiran 15. Hasil Perhitungan Persentase Viabilitas Sel Kombinasi Ekstrak HD dan Ekstrak AM (Replikasi 1).....	78
Lampiran 16. Hasil Perhitungan Persentase Viabilitas Sel Kombinasi Ekstrak HD dan Ekstrak AM (Replikasi 2).....	79
Lampiran 17. Hasil Perhitungan Persentase Viabilitas Sel Kombinasi Ekstrak HD dan Ekstrak AM (Replikasi 3).....	80
Lampiran 18. Hasil Perhitungan CI Kombinasi Ekstrak HD dan Ekstrak AM (Replikasi 1).....	81
Lampiran 19. Hasil Perhitungan CI Kombinasi Ekstrak HD dan Ekstrak AM (Replikasi 2).....	82
Lampiran 20. Hasil Perhitungan CI Kombinasi Ekstrak HD dan Ekstrak AM (Replikasi 3).....	83
Lampiran 21. Hasil Pengamatan Perlakuan Kombinasi Ekstrak HD dan AM Menggunakan Mikroskop Inverted	84
Lampiran 22. Dokumentasi Penelitian.....	86






HALAMAN PENGESAHAN
TUGAS AKHIR

EFEK KOMBINASI EKSTRAK RUMPUT LIDAH ULAR (*Hedyotis diffusa* WILLD.) DAN EKSTRAK SIRSAK (*Annona muricata* LINN.) TERHADAP VIABILITAS SEL KANKER PAYUDARA MCF-7

Oleh:
Billy Kurniawan
145070500111012

Telah diuji pada
Hari : Senin
Tanggal : 9 Juli 2018
dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I


dr. Hidayat Sujuti, Sp.M., Ph.D
NIK. 196701231996011001

Pembimbing-I/Penguji-II,


Dra. Diana Lyrawati, M.S., Ph.D., Apt
NIK. 2016099210192001

Pembimbing-II/Penguji-III,


Ika Putri Nurhayati, M.Sc., Apt
NIK. 2013048909152001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,


Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt., M.Si
NIP. 195408231981032001



ABSTRAK

Kurniawan, Billy. 2018. **Efek Kombinasi Ekstrak Rumput Lidah Ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan Ekstrak Sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap Viabilitas Sel Kanker Payudara MCF-7.** Tugas Akhir. Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dra. Diana Lyrawati, M.Si., PhD., Apt (2) Ika Putri N,M.Sc.,Apt.

Kanker payudara merupakan masalah kesehatan yang besar bagi masyarakat, karena menjadi penyebab utama kematian wanita di dunia. Angka kejadian kanker payudara mengalami peningkatan baik di Indonesia maupun di dunia. Rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) sudah lama digunakan sebagai obat antikanker dalam pengobatan tradisional, dan diketahui dapat menghambat pertumbuhan tumor dengan menghambat proliferasi sel melalui jalur siklus sel. Sirsak (*Annona muricata* Linn.) diketahui memiliki kandungan annonaceous acetogenin yang juga memiliki efek antikanker, dengan mekanisme melalui jalur apoptosis dan hambatan pada siklus sel. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik dari masing-masing ekstrak dan kombinasinya terhadap viabilitas sel kanker payudara MCF-7. Metode uji sitotoksik tunggal dan kombinasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode MTT. Hasil uji sitotoksik tunggal menunjukkan bahwa ekstrak HD dan ekstrak AM mempunyai efek sitotoksik terhadap sel MCF-7 dengan nilai IC_{50} masing-masing ekstrak yaitu HD sebesar $930 \pm 52,199 \mu\text{g/ml}$ dan ekstrak AM sebesar $138 \pm 15,949 \mu\text{g/ml}$. Hasil uji kombinasi ekstrak HD dan AM menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak HD dan AM memiliki efek sinergis kuat pada kombinasi dosis HD sebesar $116 \mu\text{g/ml}$ dan Am sebesar $17 \mu\text{g/ml}$ dengan nilai CI 0,313. Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa ekstrak HD dan ekstrak AM memiliki efek sitotoksik terhadap sel MCF-7, dan kombinasi ekstrak HD dan AM memiliki efek sinergis kuat.

Kata kunci: *Hedyotis diffusa*, *Annona muricata*, sel MCF-7, *Combination index*

ABSTRACT

Kurniawan, Billy. 2018. *The Combination of Snake Tongue Grass (Hedyotis diffusa Willd.) and Soursop (Annona muricata Linn.) toward MCF-7 Breast Cancer Cells Viability*. Thesis. Pharmacy Program of Medical Faculty Brawijaya University. Adviser: (1) Dra. Diana Lyrawati, M.Si., PhD., Apt (2) Ika Putri N,M.Sc.,Apt.

Breast cancer is a serious health problem and leading cause of death for women in the world. Snake tongue grass (*Hedyotis diffusa* Willd.) has been used as anticancer drugs to inhibit tumor growth by decreasing proliferation of cells through the cell cycle pathway. Soursop (*Annona muricata* Linn.) containing annonaceous acetogenin show anticancer effects by increasing apoptosis and inducing the cell cycle arrest. The purpose of this study is to investigate the cytotoxic effects of single extract and the combination of *Hedyotis diffusa* Willd extract (HD) and *Annona muricata* Linn. (AM) extract on viability of MCF-7 cells. Cytotoxic test used in this research is MTT assay. HD and AM extract performed cytotoxic effect toward MCF-7 cells with IC50 values are $930 \pm 52.199 \mu\text{g/ml}$ and $138 \pm 15.949 \mu\text{g/ml}$ for HD and AM respectively. Combination of HD and AM extracts exhibit a strong synergistic effect at the concentration of $116 \mu\text{g/ml}$ HD extract dan $17 \mu\text{g/ml}$ AM extract with CI value 0.313. Based on those results, it can be concluded that the HD and AM extract does not have the cytotoxic effect against MCF-7 cells, but the combination of extracts of HD and AM demonstrated strong synergistic effect.

Keywords: *Hedyotis diffusa*, *Annona muricata*, MCF-7 cell, Combination index

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker payudara merupakan penyebab utama kejadian dan kematian oleh kanker pada wanita. Di Indonesia insidensi kanker payudara berdasarkan *Age Standardized Ratio* (ASR) tahun 2000 adalah sebesar 20,6 (20,6/100.000 penduduk), sedangkan untuk mortalitas adalah sebesar 10,1 (10,1/100.000 penduduk) dengan jumlah kematian akibat kanker payudara sebesar 10.753 (Ramli, 2003). Kanker payudara merupakan masalah kesehatan yang besar bagi masyarakat, karena mortalitas dan morbiditasnya yang tinggi. Jumlah kasus kanker payudara di dunia menduduki peringkat kedua setelah kanker serviks, disamping itu kanker payudara menjadi penyebab utama kematian wanita di dunia dan adanya kecenderungan peningkatan kasus baik di dunia maupun di Indonesia (Kelsey, 2003)

Berdasarkan survey *Global Burden Cancer* (GLOBOCAN), yang diadakan oleh *International Agency for Research on Cancer* (IARC) tahun 2012 terdapat 14.067.894 kasus baru kanker dan 8.201.575 kematian akibat kanker di seluruh dunia dan merupakan penyebab kematian ke dua di dunia. Menurut *American Cancer Society* (ACS), kanker payudara merupakan kanker paling umum kedua yang terjadi pada wanita di seluruh dunia dengan insidens 38 kasus per 100.000 perempuan, dan hampir 1,7 juta kasus baru pada tahun 2012 (ACS,). Data IARC pada tahun 2012 menunjukkan bahwa kanker payudara merupakan penyakit kanker dengan persentase kasus baru tertinggi yaitu sebesar 43,3% dan persentase kematian sebesar 12,9%. Penyebab pasti kanker

payudara belum diketahui, banyak faktor yang dapat mempengaruhi terjadinya kanker payudara, oleh karena itu banyak dilakukan penelitian mengenai kanker payudara, terutama faktor resiko yang dapat menyebabkan terjadinya kanker payudara (Stephen, 2002).

Menurut Yeh dkk (2014), meskipun sudah ada perkembangan untuk terapi kanker payudara saat ini, faktor yang mempengaruhi kualitas hidup pasien, seperti rasa nyeri, kelelahan, lemas, efek samping dari kemoterapi dan radioterapi, serta gejala-gejala menopause perlu diperhatikan karena menimbulkan ketidaknyamanan pada pasien. Bahkan sebanyak 70% pasien kanker payudara meminta diberikan terapi komplementer karena dianggap dapat memperbaiki kualitas hidup pasien dan memiliki efek samping yang minimal. Terapi komplementer yang sudah lama digunakan salah satunya adalah pengobatan herbal. Produk dari tumbuhan terus membuat dampak yang besar dalam pengembangan obat baru, terutama sebagai obat untuk penyakit kanker. Menurut Schmidt dkk (2008), dari 155 obat-obatan antikanker yang telah dikembangkan sejak tahun 1940, 47% dari total tersebut berasal dari produk alami ataupun turunannya.

Tanaman rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd). sudah lama digunakan dan diteliti aktivitas antikankernya. Hasil penelitian dari Cao dkk (2012) menunjukkan bahwa ramuan *Traditional Chinese Medicine* (TCM) yang mengandung 30 gram *Hedyotis diffusa* Willd dapat menghambat pertumbuhan tumor dengan mentarget beberapa jalur dan menghambat proliferasi sel melalui jalur siklus sel. Hasil penelitian dari Lin dkk (2010) juga menunjukkan bahwa *Hedyotis diffusa* Willd dapat menghambat *angiogenesis* dan menginduksi apoptosis sel tumor melalui jalur *mitochondrion-dependent* pada sel karsinoma

kolon. Penelitian lain dari Shi dkk (2008) menunjukkan dua senyawa antrakuinon dari *Hedyotis diffusa* Willd yaitu *2-hydroxy-3-methylantraquinone* dan *1-methoxy-2-hydroxyanthraquinone* memiliki efek menghambat *protein tyrosine kinases v-src* dan *pp60src*, serta menghambat pertumbuhan dari sel kanker *SPC-1-A*, *Bcap37*, dan *HepG2*.

Sirsak (*Annona muricata* Linn) merupakan tanaman yang banyak dijumpai di Indonesia dan buahnya sering dikonsumsi oleh masyarakat. Bagian tanaman yang sering digunakan sebagai pengobatan tradisional antara lain daun dan buahnya. Berdasarkan beberapa penelitian, *acetogenin* dari *Annonaceae* memiliki aktivitas antikanker. Isolat *annonacin*, *isoannonacin*, *goniothalamycin*, dan *gigantetrocin* dari biji buah yang sudah matang memiliki efek sitotoksik pada kanker paru-paru *A-549*, pada kanker payudara *MCF-7*, dan pada kanker kolon *HT-29* (Badrie dkk, 2009). Penelitian lain juga menunjukkan bahwa isolat *annonacin* dapat menghambat pertumbuhan sel dan menginduksi apoptosis pada sel *MCF-7* melalui jalur *estrogen receptor-alfa* (Yu-Min dkk, 2011).

Pemberian kombinasi ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* WILLD.) dan ekstrak sirsak (*Annona muricata* LINN.) mampu menurunkan dosis ekstrak yang digunakan sehingga efek samping yang dihasilkan minimal, maka kualitas hidup pasien tidak menurun dan tidak mengganggu kenyamanan serta aseptabilitas pasien. Selain itu, ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* WILLD.) dan ekstrak sirsak (*Annona muricata* LINN.) memiliki mekanisme kerja melalui jalur yang berbeda sehingga apabila dilakukan kombinasi ekstrak diharapkan lebih efektif dalam mengobati kanker.

Berdasarkan uraian diatas, dilakukan penelitian mengenai efek sitotoksik kombinasi ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* WILLD.) dan

ekstrak sirsak (*Annona muricata* LINN.) melalui pengamatan terhadap hambatan proliferasi sel yang terjadi pada sel MCF-7 secara *in vitro*, mengukur nilai IC50 tiap ekstrak dan *combination index* (CI) dari kombinasi ekstrak. Setelah dilakukan penelitian mengenai efek sitotoksik kombinasi ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* WILLD.) dan ekstrak sirsak (*Annona muricata* LINN.) maka dapat diketahui efektivitas, jenis interaksi sitotoksik yang terjadi pada sel kanker payudara MCF-7 serta dosis kombinasi ekstrak rumput lidah ular dan ekstrak sirsak yang sinergis sebagai terapi kanker payudara.

1.2 Rumusan Masalah

- 1.2.1 Apakah ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan ekstrak sirsak (*Annona muricata* Linn.) berefek sitotoksik pada kultur sel MCF-7 berdasarkan nilai viabilitas sel?
- 1.2.2 Apakah jenis interaksi sitotoksik antara ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan ekstrak sirsak (*Annona muricata* Linn.) pada kultur sel MCF-7 berdasarkan *combination index* (CI)?
- 1.2.3 Berapa dosis kombinasi ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan ekstrak sirsak (*Annona muricata* Linn.) yang mampu memberikan efek sinergisme pada kultur sel kanker payudara MCF-7?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui bahwa kombinasi ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* WILLD.) dan ekstrak sirsak (*Annonae muricata* LINN.) dapat memberikan efek sitotoksik dari pada kultur sel MCF-7.

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Mengetahui jenis interaksi sitotoksik antara ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* WILLD.) dan ekstrak sirsak (*Annonae muricata* LINN.) pada kultur sel MCF-7 berdasarkan combination index (CI).

1.3.2.2 Menentukan dosis kombinasi ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Wild.) dan ekstrak sirsak (*Annonae muricata* LINN.) yang mampu memberikan efek sinergisme pada kultur sel kanker payudara MCF-7.

1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini antara lain:

1.4.1 Manfaat Akademik

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi yang berguna bagi pengembangan ilmu pengetahuan bidang bahan alam dan biomedik terutama mengenai jenis interaksi sitotoksik dan kombinasi dosis antara ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* WILLD.) dan ekstrak sirsak (*Annona muricata* LINN.) yang memberikan interaksi sinergis terhadap sel kanker payudara.

1.4.2 Manfaat Praktis

Melalui penelitian ini diharapkan mahasiswa dapat berkontribusi dalam pengembangan obat herbal tradisional untuk terapi penunjang kanker payudara menggunakan ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan ekstrak sirsak (*Annona muricata* Linn.).



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Payudara

2.1.1 Definisi

Kanker adalah penyakit yang disebabkan adanya pertumbuhan sel-sel baru yang liar karena sel-sel tersebut pertumbuhannya terlepas dari sistem kendali pertumbuhan normal sehingga merusak bentuk dan atau fungsi organ atau jaringan yang terserang. (Chalasan dkk, 2010).

Kanker payudara merupakan jenis kanker yang dianggap sebagai ancaman hidup terbesar bagi wanita. Kanker payudara adalah pertumbuhan sel yang abnormal pada jaringan payudara seseorang. Payudara wanita terdiri dari lobulus (kelenjar susu), duktus (saluran susu), lemak dan jaringan ikat, pembuluh darah dan kelenjar limfe. Sebagian besar kanker payudara bermula pada sel-sel yang melapisi duktus (kanker duktal), beberapa bermula di lobulus (kanker lobular), serta sebagian kecil bermula di jaringan lain (Chalasan dkk,2010)

Pada awal pembentukan benjolan, biasanya penderita tidak merasakan adanya gejala apa pun atau disebut asimtomatik. Gejala yang dapat ditemukan pada penderita kanker payudara antara lain perubahan ukuran payudara, terjadinya *dimpling*, abnormalitas puting, dan perbesaran di daerah aksilla. Proses terbentuknya kanker berasal dari perubahan molekular pada tingkat sel. Telah dilakukan *screening genomic* dan ditemui sebuah kesimpulan bahwa keberagaman kanker payudara dilihat dari keberadaan reseptor estrogen, reseptor progesteron, dan terakhir yang paling menentukan adalah reseptor HER-2 (Chalasan dkk, 2015).

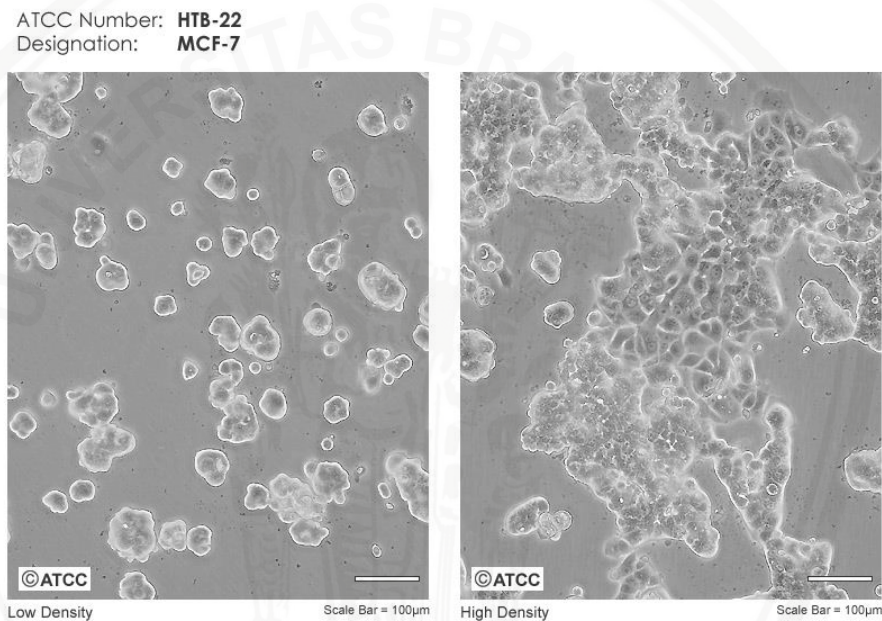
2.1.2 Patofisiologi

Kanker secara umum disebabkan oleh kerusakan DNA akibat faktor intrinsik dan ekstrinsik, sehingga terjadi mutasi genetik yang menyebabkan gangguan pada siklus sel (proliferasi) dan gangguan apoptosis sel. Sel normal memiliki respon terhadap kerusakan DNA, yaitu hambatan proliferasi dan induksi apoptosis. Hambatan proliferasi pada sel secara umum salah satunya dipengaruhi oleh p21 dan p53, sedangkan untuk induksi apoptosis pada sel normal diinduksi oleh Bax dan Fas (pro-apoptosis). Pada kanker payudara, *Breast Cancer Associated Gene 1* (BRCA1) memiliki banyak peran dan berinteraksi dengan banyak protein yang terlibat dalam proses biologis. BRCA1 terlibat dalam semua fase siklus sel dan berperan mengatur regulasi selama siklus sel berlangsung. Apabila terjadi mutasi atau defisiensi pada BRCA1 maka dapat menyebabkan kelainan pada pemeriksaan fase S, fase G2/M, pemeriksaan *spindle* dan duplikasi kromosom. Adanya gangguan pada saat pemeriksaan tersebut dapat memicu respon seluler terhadap kerusakan *deoxyribonucleic acid* (DNA) yang menghambat proliferasi sel dan menginduksi apoptosis. Kegagalan dalam mendeteksi kerusakan DNA menyebabkan sel tidak merespon terhadap kerusakan DNA tersebut sehingga dapat terjadi peningkatan proliferasi dan hambatan apoptosis (Deng, 2006).

2.2 Sel MCF-7

Pada kanker payudara didapatkan lini sel yang berpengaruh terhadap perkembangan sel kanker, yaitu MCF-7. MCF-7 memiliki karakteristik yaitu mengekspresikan reseptor estrogen (ER) dan tidak mengekspresikan reseptor progesterone (PR) dan HER2. Hal ini membuat MCF-7 menjadi model yang baik untuk mempelajari respon hormon (Holliday dan Speirs, 2011). MCF-7 hanya akan

membentuk tumor dengan kehadiran estrogen, dan pertumbuhannya dapat dihambat dengan menggunakan terapi *anti-4 estrogen*. Sel MCF-7 dapat digunakan pada penelitian untuk menguji efek kanker payudara secara *in vitro* karena menyerupai sel epitel yang tumbuh *monolayer* dan didapat dari efusi pleural metastasis penderita kanker payudara. Karakteristik lain yang terdapat pada sel MCF-7 adalah membentuk kultur selapis dan dapat ditumbuhkan dalam *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) (Widowati dkk, 2009).



Gambar 2.1. Sel MCF-7 Normal (ATCC, 2008)

2.3 Rumput Lidah Ular (*Hedyotis diffusa* Willd.)/ *Oldenlandia diffusa*

2.3.1 Taksonomi

Struktur taksonomi dari *Hedyotis diffusa* Willd adalah sebagai berikut

(Cho,2011):

Kingdom : Plantae

Super divisi : Spermatophyta

Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Asteridae
Ordo	: Gentianales
Famili	: Rubiaceae
Genus	: Hedyotis
Spesies	: <i>Hedyotis diffusa</i> Willd.
Sinonim	: <i>Oldenlandia diffusa</i> Willd.

2.3.2 Deskripsi

Hedyotis diffusa Willd atau yang dikenal sebagai *Oldenlandia diffusa* Willd merupakan suatu herba yang tersebar di Asia tropis seperti Cina, Jepang, dan Indonesia. *Hedyotis diffusa* merupakan suatu tumbuhan yang tumbuh pada daerah lembab dan pegunungan. Tumbuhan ini dapat berkembang hingga 50cm, batangnya berbentuk bulat agak pipih, beruas-ruas dan licin berwarna kuning kehijauan atau hijau kemerahan. Daun dari *Hedyotis diffusa* berbentuk runcing, linier dengan luas 1-4 cm x 0,1 -0,4 cm, berwarna hijau dan tidak bertangkai. Bunganya tunggal dan berwarna putih dan dapat ditemukan pada ketiak daun. Akar dari tumbuhan ini merupakan akar serabut yang berwarna putih kekuningan (Chen, 2016).



Gambar 2.2. *Hedyotis diffusa* Willd. (Cho, 2011).

2.3.3 Kandungan Fitokimia

Hedyotis diffusa memiliki kandungan fitokimia yang penting, seperti iridoid, triterpen, antrakuinon, *flavonoid*, asam fenol dan turunannya seperti *sterol*, alkaloid, minyak volatil, polisakarida, kumarin, dan alkaloid. Hingga saat ini sudah ditemukan kandungan dari *Hedyotis diffusa* yaitu 32 jenis iridoid. Iridoid merupakan salah satu komponen terbesar dalam tumbuhan ini dan memiliki kemampuan bioaktif seperti antioksidan, neuroprotektif, dan anti-inflamasi. Selain itu juga didapatkan 4 komponen triterpen yaitu *arborinone*, *isoarborinol*, asam oleat dan asam ursolat. Ditemukan pula 26 jenis *flavonoid* yang juga merupakan komponen terbesar dari *Hedyotis diffusa* selain iridoid. *Flavonoid* yang ditemukan sebagian besar merupakan turunan dari *aglicone flavonol* dari kaemferol dan *quercetin*. Selain itu, ditemukan juga 24 jenis *antraquinon* dengan beragam *substituent*. Ditemukan pula metabolit sekunder berupa 26 jenis *fenol* dan turunannya, 50 minyak volatil, dan 13 jenis zat lain (Chen, 2016).

2.3.4 Aktivitas Antikanker

Aktivitas antikanker *Hedyotis diffusa* Willd. pada sel kanker payudara MCF-7 adalah adanya senyawa *methylanthraquinone* yang terdapat pada rumput lidah ular yang mampu menginduksi apoptosis dari Sel MCF-7 melalui jalur *Ca²⁺/calpain/caspase-4* (Liu dkk., 2010). Dua senyawa antrakuinon dari *Hedyotis diffusa* Willd yaitu *2-hydroxy-3-methylanthraquinone* dan *1-methoxy-2-hydroxyanthraquinone* juga memiliki efek menghambat *protein tyrosine kinases v-src* dan *pp60src*, serta menghambat pertumbuhan dari sel kanker *SPC-1-A*, *Bcap37*, dan *HepG2* (Shi dkk, 2008)

2.4 Sirsak (*Annona muricata* Linn.)

2.4.1 Taksonomi

Berikut adalah taksonomi dari *Annona muricata* (Syamsuhidayat, 1991):

Kingdom	: Plantae
Super divisi	: Tracheophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Magnoliales
Famili	: Annonaceae
Genus	: <i>Annona</i>
Spesies	: <i>Annona muricata</i>

2.4.2 Deskripsi

Annona muricata atau yang dikenal dengan sirsak merupakan suatu suatu tumbuhan yang tersebar pada daerah subtropis dan tropis. *Annona muricata* merupakan bagian dari tumbuhan famili Annonaceae. Tumbuhan ini merupakan

tumbuhan hijau dengan tinggi mencapai 5-8 meter dengan batang berwarna coklat dan memiliki daun mengkilap, agak bulat, dan berwarna hijau tua. Buah dari *A. muricata* berbentuk hati dan besar, berwarna hijau dan berdiameter 15-20 cm (Syamsuhidayat, 1991).



Gambar 2.3. Tanaman sirsak

2.4.3 Kandungan Fitokimia

Kandungan kimia yang ditemukan pada *Annona muricata* berupa alkaloid, flavonol triglikosida, fenol, siklopeptida, dan minyak esensial. Komponen yang terkenal dari *Annona muricata* adalah senyawa *annonaceous acetogenins* (AGEs) (Reiser, 1993).

2.4.4 Aktivitas Antikanker

Mekanisme sitotoksitas dari beberapa senyawa acetogenin terhadap sel kanker adalah melalui jalur apoptosis dan hambatan pada siklus sel. Senyawa *bullatacin acetogenin* dapat mengurangi produksi ATP melalui hambatan pada sistem transpor elektron di mitokondria, yang dapat menyebabkan terjadinya apoptosis. *Annonacin acetogenin* dapat menginduksi apoptosis melalui inhibisi protein anti-apoptosis Bcl-2 dan Bcl-xL. Selain itu senyawa *annonacin acetogenin*

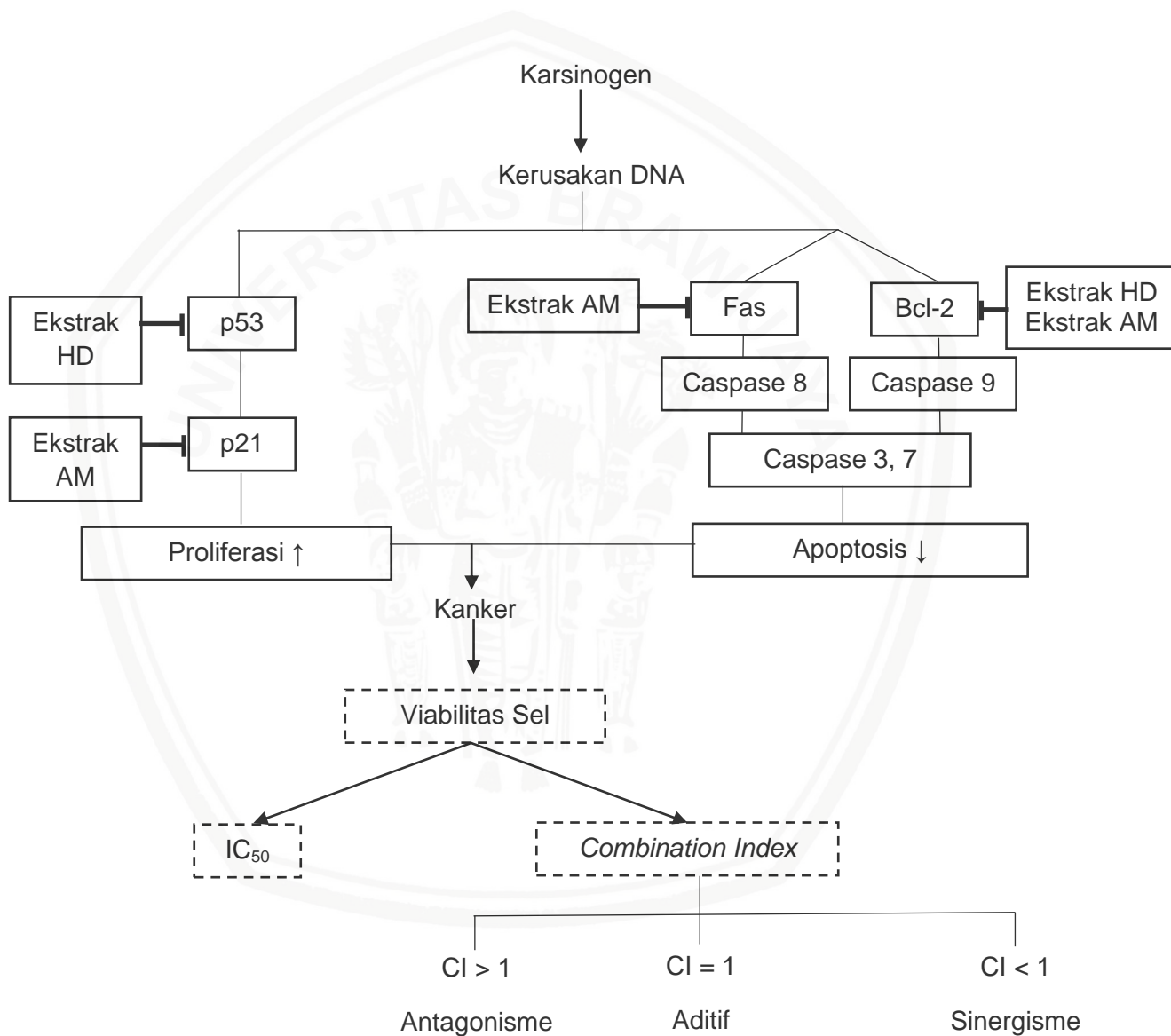
juga dapat menghambat pertumbuhan sel pada fase G₀/G₁ melalui peningkatan ekspresi p21 dan p27, serta penurunan *cyclin D1* (Rachmani dkk, 2011).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan:
 : menghambat
 : variabel yang tidak diteliti
 : variabel yang diteliti

Adanya kerusakan DNA yang disebabkan oleh faktor intrinsik dan ekstrinsik, menyebabkan adanya regulasi gen penekan tumor yaitu p53. Gen p53 menjaga homeostasis dengan cara menginduksi ekspresi protein p21, dimana protein p21 sangat berperan penting dalam regulasi siklus sel. Protein p21 akan menghambat kompleks *cyclin E-CDK2*, *cyclin A-CDK1*, dan *cyclin B-CDK1*. Kompleks *cyclin E-CDK2* meregulasi transisi dari fase G₁ ke fase S, dimana *checkpoint* G₁-S mengawasi integritas DNA sebelum replikasi DNA. *Cyclin A-CDK1* aktif pada fase S, sedangkan *Cyclin B-CDK1* meregulasi transisi dari fase G₂ ke fase M, dimana *checkpoint* G₂-M memastikan DNA setelah replikasi dan mengawasi sel hingga dapat memasuki fase mitosis.

Apoptosis terjadi dalam dua jalur yaitu jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik. Jalur ekstrinsik terjadi ikatan antara reseptor Fas (CD95/Apo-1) dengan ligan FasL, serta reseptor TRAIL-R1 (DR4) dan TRAIL-R2 (DR5/Killer/TRICK 2) dengan ligan TRAIL. Kompleks ligan-reseptor ini kemudian berikatan dengan adaptor FADD (*Fas Associated Death Domain*) membentuk kompleks DISC (*Death Inducing Signaling Complex*). Kompleks DISC akan menginduksi caspase 8 yang kemudian menginduksi protein pro apoptosis Bid. Protein Bid kemudian menginduksi tBid sehingga menyebabkan adanya perubahan permeabilitas membran sel. Gangguan permeabilitas sel ini selanjutnya menyebabkan pengeluaran sitokrom C. Sitokrom C mengikat dan mengaktivasi Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor*) yang disebut dengan procaspase 9 dan membentuk apoptosome. *Procaspase 9* selanjutnya teraktivasi menjadi *caspase 9*, dimana *caspase 9* merupakan inisiator apoptosis. *Caspase 9* selanjutnya mengaktivasi *caspase* efektor seperti *caspase 3* dan *caspase 7* sehingga terjadi apoptosis. Adanya radikal bebas, hipertermia, toksin, infeksi bakteri, dan hipoksia

menyebabkan apoptosis sel jalur intrinsik. Pada jalur intrinsik terjadi hambatan pada protein anti-apoptosis yaitu Bcl-2. Induksi pada protein anti apoptosis ini menyebabkan peningkatan protein pro-apoptosis yaitu Bax. Peningkatan Bax menyebabkan gangguan permeabilitas sel dan memicu pengeluaran sitokrom c. Selain pada jalur ekstrinsik dan intrinsik, apoptosis juga dapat diregulasi oleh gen p53.

Dalam pengobatan *Traditional Chinese Medicine* (TCM) banyak digunakan ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* WILLD.) untuk membantu mengobati kanker payudara. Ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* WILLD.) diketahui dapat menginduksi gen p53, sehingga p53 dapat mensupresi adanya proliferasi sel yang berlebihan dan menginduksi terjadinya apoptosis. Selain itu, ekstrak rumput lidah ular juga dapat menginduksi Fas, TRAIL, Bax, caspase 8, caspase 9, caspase 3, dan caspase 7 serta menghambat Bcl-2. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekstrak sirsak (*Annona muricata* Linn.) memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker. Mekanisme sitotoksik senyawa acetogenin dari ekstrak sirsak adalah melalui jalur apoptosis dan hambatan proliferasi sel dengan berbagai mekanisme, salah satunya yaitu melalui hambatan pada siklus sel sehingga proliferasi sel terhambat. Hambatan pada siklus sel oleh ekstrak sirsak terjadi melalui gangguan pada membrane mitokondria yang menyebabkan hambatan pada fase G0/G1, sehingga siklus sel terhenti (*cell cycle arrest*). Penghentian siklus sel pada sel kanker dapat mengarah ke kematian sel atau apoptosis. Mekanisme sitotoksik lain dari senyawa acetogenin antara lain dengan mengurangi produksi ATP melalui hambatan NADH pada sistem transport elektron sehingga menyebabkan terjadinya apoptosis, kemudian menginduksi apoptosis melalui hambatan pada protein anti-apoptosis dan induksi protein pro-

apoptosis, serta melalui aktivasi caspase 9, caspase 3, dan caspase 7. Berdasarkan data tersebut, dalam penelitian ini akan dilakukan kombinasi dua ekstrak, yaitu ekstrak rumput lidah ular dan ekstrak sirsak dengan beberapa dosis yang berbeda dan diukur viabilitas sel menggunakan uji MTT untuk mengetahui jenis interaksi yang terjadi dari kombinasi kedua ekstrak dan dosis kombinasi yang tepat untuk menghasilkan efek sinergis dari kedua kombinasi ekstrak tersebut.

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah:

1. Ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan sirsak (*Annona muricata* Linn.) memiliki efek sitotoksik pada kultur sel MCF-7 berdasarkan viabilitas sel.
2. Pemberian kombinasi ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan sirsak (*Annona muricata* Linn.) pada kultur sel MCF-7 menghasilkan interaksi sinergis berdasarkan nilai *combination index*.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain eksperimen murni (*true experimental design*) menggunakan *randomized post test only controlled group design* yang dilakukan secara *in vitro* untuk mengetahui jenis interaksi sitotoksik dan dosis kombinasi antara ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dengan ekstrak sirsak (*Annonae muricata* Linn.) yang menghasilkan efek sinergis terhadap kultur sel MCF-7.

4.2 Subjek Penelitian

Subjek dalam penelitian ini adalah lini sel kanker payudara MCF-7. Sel MCF-7 diperoleh dari *American Type Culture Collection* (ATCC) yang tersedia di Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.3 Variabel Penelitian

Penelitian ini memiliki tiga macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel terikat, dan variabel kontrol. Variabel bebas yang digunakan adalah konsentrasi ekstrak rumput lidah ular (*Hedyotis diffusa* Willd.) dan ekstrak sirsak (*Annonae muricata* Linn.). Variabel terikat yang digunakan adalah nilai IC_{50} yang didapat dari hasil uji MTT pada uji sitotoksik tunggal dan nilai *combination index* yang dihitung menggunakan dosis IC_{50} dari hasil uji MTT pada seri konsentrasi ekstrak yang berbeda yaitu $1/8 IC_{50}$, $2/8 IC_{50}$, $3/8 IC_{50}$, dan $4/8 IC_{50}$. Variabel kontrol yang digunakan adalah sel MCF-7, waktu inkubasi, dan kondisi inkubasi yaitu $37^{\circ}C \pm 5\% CO_2$.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di beberapa tempat. Proses ekstraksi dilaksanakan di Laboratorium Farmakognosi dan Fitoterapi Farmasi FKUB, sedangkan kultur sel dan perlakuan yang diberikan pada kultur sel akan dilaksanakan di Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian ini akan dilakukan mulai dari Oktober 2017 hingga Mei 2018.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Ekstraksi Rumput Lidah Ular dan Ekstrak Sirsak

Bahan yang dibutuhkan untuk ekstraksi yaitu herba rumput lidah ular, daun sirsak kering, dan etanol 80%. Herba rumput lidah ular didapatkan dari rumput lidah ular yang tumbuh liar di daerah Banyuwangi, sedangkan daun sirsak kering didapatkan dari Balai Materia Medika (BMM) Kota Batu. Herba rumput lidah ular dan daun sirsak kering telah diidentifikasi spesies oleh BMM Kota Batu, Jawa Timur. Alat yang digunakan adalah toples (maserator), *rotary evaporator*, batang pengaduk, spatel, stirrer, erlenmeyer, cawan porselen, oven, dan timbangan analitik.

4.5.2 Kultur Sel

Bahan yang dibutuhkan untuk kultur sel antara lain sel MCF-7, alkohol 70%, Penisilin-Streptomisin, FBS, *Rospark Memorial Institute* (RPMI), *Water For Injection* (WFI), HEPES, Natrium bikarbonat, Tripsin-EDTA, DMSO, *cryo tube*, membran filter 0,22 μm (Merck Milipore), *flask* dengan luas permukaan 25 cm^2 , *conical tube* 15 ml dan 50 ml, botol duran 250 ml, *microplate* 96 sumuran, spuit 10 ml, pipet volume 2 ml, tip biru dan kuning, *handschoen*, spidol, kaca penutup, label, masker, aluminium foil, dan tissue. Alat yang dibutuhkan yaitu spatel, sentrifus,

accu *jet*, inkubator yang dilengkapi tabung gas CO₂, *laminar air flow* (LAF), mikropipet, pH meter, hemasitometer, *counter* serta timbangan analitik.

4.5.3 Pemaparan Ekstrak pada Sel Kultur

Bahan yang dibutuhkan untuk pemaparan ekstrak pada sel kultur adalah DMSO, media kultur (MK), *microtube*, dan *conical tube*. Alat yang digunakan adalah mikropipet, *vortex*, timbangan, spuit 3 ml, membran filter 0,22 µm, dan LAF.

4.5.4 Penentuan IC₅₀ menggunakan Uji MTT

Bahan yang dibutuhkan untuk menentukan nilai IC₅₀ dengan uji MTT adalah 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromida (MTT), Media RPMI, dan DMSO. Alat yang digunakan yaitu *microplate reader*.

4.5.5 Uji Sitotoksik Kombinasi Kemoterapi

Bahan yang dibutuhkan untuk uji sitotoksik antara lain MK, MTT, Media RPMI, dan DMSO. Alat yang digunakan yaitu *microplate reader*, mikropipet, *conical tube*, *plate* 96 sumuran.

4.6 Definisi Istilah/Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini antara lain:

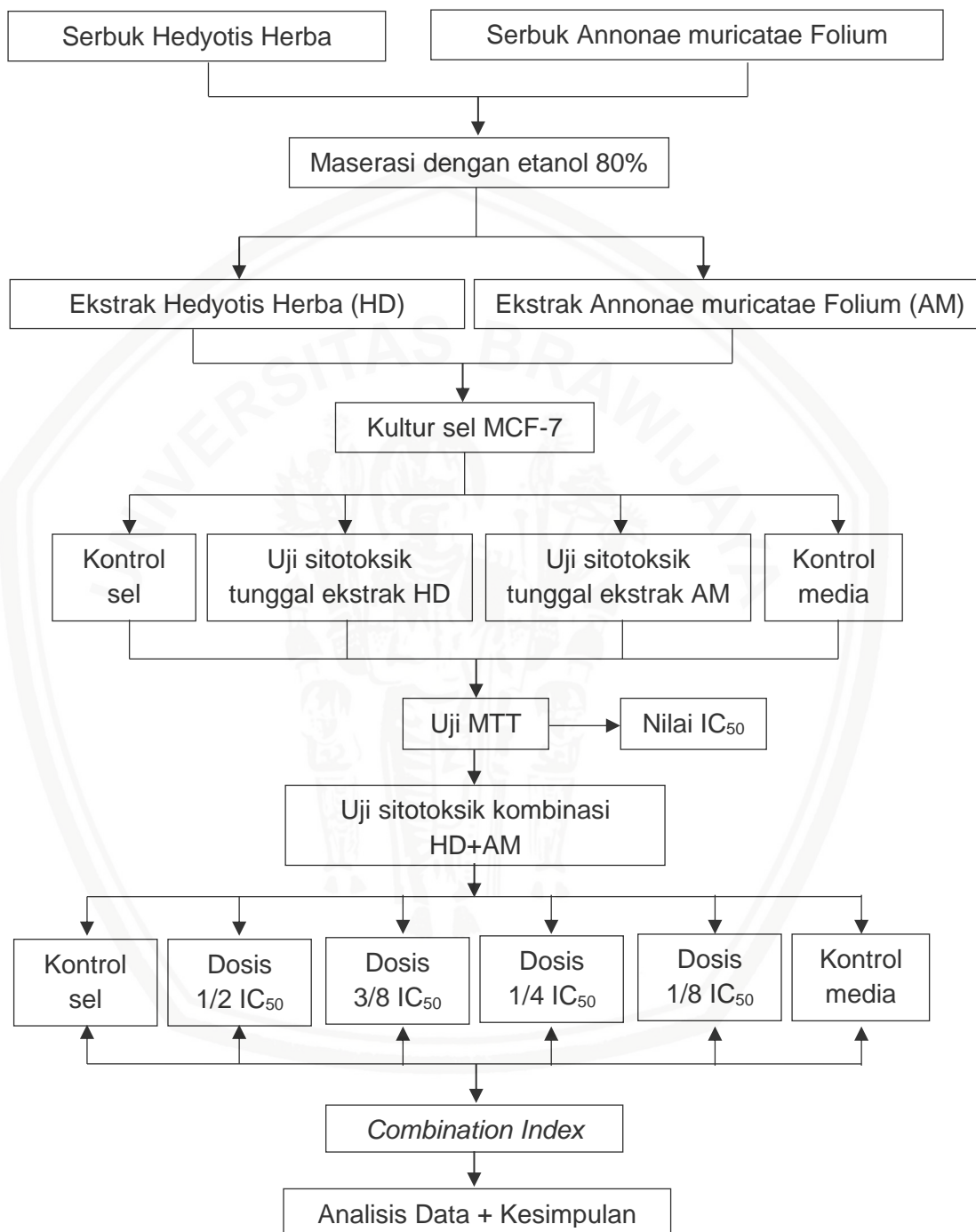
1. Ekstrak rumput lidah ular dan ekstrak sirsak didapatkan melalui metode ekstraksi yaitu maserasi menggunakan etanol 80%.
2. Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi simplisia yang menggunakan pelarut kemudian dilakukan pengocokan atau pengadukan serta penyaringan berulang kali dalam suhu ruang.
3. Prinsip metode MTT ialah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromide) oleh sistem

reduktase. Pada mitokondria sel yang hidup, MTT akan bereaksi dengan hidrogen yang berasal dari enzim dehidrogenase sehingga mengakibatkan pecahnya cincin *tetrazolium*, yang mengakibatkan terbentuknya kristal formazan berwarna ungu yang tidak larut air. Penambahan *reagen stopper* akan melarutkan kristal formazan ungu yang kemudian absorbansinya akan diukur menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang sebesar 570 nm. Intensitas warna ungu yang terbentuk sebanding dengan jumlah sel hidup. Intensitas warna ungu semakin besar, maka jumlah sel yang hidup semakin banyak.

4. IC_{50} merupakan dosis ekstrak yang didapatkan melalui pengujian MTT dimana dapat menghambat pertumbuhan atau proliferasi sel MCF-7 sebesar 50%.
5. Viabilitas sel merupakan presentase sel yang hidup.
6. *Combination index* (CI) merupakan indeks yang menunjukkan interaksi yang terjadi dalam beberapa kombinasi. Interaksi sinergis ditunjukkan dengan nilai CI kurang dari 1, interaksi adiktif ditunjukkan dengan nilai CI yaitu 1, dan interaksi antagonis ditunjukkan dengan nilai CI lebih dari 1.

4.7 **Prosedur Penelitian**

4.7.1 **Skema Prosedur Penelitian**



Gambar 4.1 Gambar Skema Prosedur Penelitian

4.7.2 Ekstraksi *Hedyotis diffusa* Willd. dan *Annona muricata* Linn.

Ekstraksi *Hedyotis diffusa* dan *Annona muricata* dilakukan dengan metode maserasi. Tahap-tahap yang diperlukan adalah sebagai berikut:

- a. Ditimbang serbuk kering rumput lidah ular dan serbuk kering daun sirsak sebanyak 200 gram.
- b. Diredam dalam etanol 80% dengan perbandingan 1:10 (1 L etanol).
- c. Diredam selama 30 menit disertai pengadukan menggunakan stirrer dengan kecepatan 500 rpm.
- d. Didiamkan selama 24 jam dalam toples (maserator) yang tertutup rapat.
- e. Disaring untuk memisahkan maserat menggunakan vakum, corong Buchner dan kertas saring.
- f. Maserat ditampung dalam erlemeyer.
- g. Residu di re-maserasi sebanyak 2x menggunakan 0,5 L etanol 80%.
- h. Semua maserat ditampung, dicampur dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dengan kecepatan putar sebesar 30 rpm.
- i. Cawan porselen kosong ditimbang sebelum digunakan sebagai wadah ekstrak.
- j. Ekstrak pekat yang dihasilkan dikeringkan dalam oven pada suhu 45°C hingga terbentuk pasta.
- k. Ditimbang kembali ekstrak setelah dikeringkan.
- l. Dihitung % rendemen menggunakan rumus dibawah ini.

$$\%rendemen = \frac{(\text{berat ekstrak} - \text{berat cawan kosong})}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

4.7.3 Kultur Sel MCF-7

4.7.3.1 Preparasi Media Kultur Roswell Park Memorial Institute (RPMI)

Komposisi media yang digunakan yaitu:

RPMI	2,6 gram
Natrium Bikarbonat (NaHCO_3)	0,5 gram
HEPES	0,55 gram
<i>Water for Injection</i> (WFI)	ad 250 ml

Tahapan yang dilakukan dalam preparasi media RPMI adalah sebagai berikut:

- a. Ditimbang 2,6 gram serbuk RPMI menggunakan neraca analitik.
- b. Dimasukkan serbuk RPMI kedalam botol duran 250 ml.
- c. Ditambahkan WFI untuk melarutkan serbuk RPMI dan dikocok hingga homogen.
- d. Ditimbang 0,5 gram serbuk NaHCO_3 menggunakan neraca analitik.
- e. Ditambahkan serbuk NaHCO_3 ke dalam botol duran (c) dan dikocok ad homogen.
- f. Ditimbang 0,55 gram HEPES menggunakan neraca analitik.
- g. Ditambahkan HEPES ke dalam botol duran (e) dan dikocok ad homogen.
- h. Ditambahkan WFI ad 250 ml kedalam botol duran (g) dan dikocok ad homogen.
- i. Diukur pH RPMI menggunakan pH meter.
- j. Diadjust pH dengan menambahkan HCl 1 M dengan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga pH berada dalam rentang 7,0 - 7,4.
- k. Difilter media RPMI menggunakan *sprit* dan membran filter 0,22 μm dalam *laminar air-flow* (LAF).

- l. Dimasukkan media RPMI ke dalam botol duran 250 ml steril.
- m. Dibungkus botol duran 250 ml menggunakan aluminium foil.
- n. Diberi label pada botol berupa nama media, tanggal pembuatan, dan nama peneliti.
- o. Disimpan media RPMI dalam lemari pendingin suhu 4°C.

4.7.3.2 Preparasi Media Kultur Lengkap (MK)

Komposisi media yang digunakan yaitu:

Penisilin-Streptomisin- <i>Amphotericin B</i>	0,5 ml
FBS	5 ml
Media RPMI	ad 50 ml

Tahapan yang dilakukan dalam preparasi media adalah sebagai berikut:

- a. Diambil media RPMI dari dalam lemari pendingin suhu 4°C.
- b. Diambil Penisilin-Streptomisin-*Amphotericin B*, dan FBS dari dalam freezer -20°C.
- c. Dikondisikan Penisilin-Streptomisin-*Amphotericin B*, FBS, dan media RPMI pada suhu ruangan sebelum digunakan.
- d. Disiapkan *conical tube* 50 ml, *sprit* 10 ml, dan membran filter 0,22 µm.
- e. Disemprot (c) dan (d) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.
- f. Diambil 0,5 ml Penisilin-Streptomisin-*Amphotericin B* menggunakan *sprit* 10 ml.
- g. Diambil 5 ml FBS menggunakan *sprit* 10 ml (f).
- h. Difilter (g) menggunakan membran filter 0,22 µm dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 50 ml.
- i. Diambil media RPMI menggunakan *sprit* 10 ml.

- j. Difilter (i) menggunakan membran filter 0,22 μm ad 50 ml dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 50 ml (h).
- k. Dikocok (j) ad homogen.
- l. Diberi label pada *conical tube* berupa nama media, tanggal pembuatan, dan nama peneliti.
- m. Disimpan MK dalam lemari pendingin suhu 4°C.

4.7.3.3 Preparasi Media Serum Free (SF)

Komposisi media yang digunakan yaitu:

Penisilin-Streptomisin- <i>Amphotericin B</i>	0,5 ml
Media RPMI	ad 50 ml

Tahapan yang dilakukan dalam preparasi media adalah sebagai berikut:

- a. Diambil media RPMI dari dalam lemari pendingin suhu 4°C.
- b. Diambil Penisilin-Streptomisin-*Amphotericin B* dari freezer -20°C.
- c. Dikondisikan Penisilin-Streptomisin-*Amphotericin B*, dan media RPMI pada suhu ruangan sebelum digunakan.
- d. Disiapkan *conical tube* 50 ml, *sputit* 10 ml, dan membran filter 0,22 μm .
- e. Disemprot (c) dan (d) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.
- f. Diambil 0,5 ml Penisillin-Streptomisin-*Amphotericin B* menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 50 ml.
- g. Diambil media RPMI menggunakan *sputit* 10 ml.
- h. Difilter (g) menggunakan membran filter 0,22 μm ad 50 ml dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 50 ml (f).
- i. Dikocok (h) ad homogen.

- j. Diberi label pada *conical tube* berupa nama media, tanggal pembuatan, dan nama peneliti.
- m. Disimpan SF dalam lemari pendingin suhu 4°C.

4.7.3.4 Penumbuhan Sel (*Cell Thawing*)

Prosedur penumbuhan sel MCF-7 adalah sebagai berikut:

- a. Diambil MK dari dalam lemari pendingin 4°C kemudian dikondisikan pada suhu ruangan sebelum digunakan.
- b. Diambil ampul (*cryo tube*) berisi sel MCF-7 dari dalam *Mr. Frosty* pada *freezer* -80°C.
- c. Dicairkan sel dalam ampul dengan cara digosok menggunakan tangan.
- d. Disiapkan *sprit* 10 ml, membran filter 0,22 µm, mikropipet, tip kuning, dan *flask*.
- k. Disemprot (a), (c), dan (d) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.
- e. Diambil 8 ml MK menggunakan *sprit* 10 ml.
- f. Difilter MK menggunakan membran filter 0,22 µm dan dimasukkan ke dalam *flask*.
- g. Diambil 200 µl sel MCF-7 menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam *flask* (e).
- h. Digoyang-goyangkan *flask* ad homogen.
- i. Diamati kondisi sel menggunakan mikroskop *inverted* dengan perbesaran 100 kali.
- j. Diberi label pada *flask* berupa nama sel, tanggal penumbuhan, jumlah pasase, dan nama peneliti.

- k. Disemprot *flask* menggunakan alkohol 70% kemudian diinkubasi dalam inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%\text{CO}_2$.

4.7.3.5 Penggantian Media

Prosedur penggantian media kultur adalah sebagai berikut:

- a. Diambil *flask* berisi sel dalam inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%\text{CO}_2$ kemudian diamati kondisi sel menggunakan mikroskop *inverted*.
- b. Diambil SF dari dalam lemari pendingin 4°C dan dikondisikan pada suhu ruang.
- c. Disiapkan *sprit* 10 ml, membran filter $0,22 \mu\text{m}$, dan wadah pembuangan.
- d. Disemprot (a), (b), dan (c) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.
- e. Dibuang media lama dalam *flask* kedalam wadah pembuangan.
- f. Diambil 2 ml SF menggunakan *sprit* 10 ml.
- g. Difilter SF menggunakan membran filter $0,22 \mu\text{m}$ dan dimasukkan ke dalam *flask* secara perlahan pada leher *flask*.
- h. Digoyang-goyangkan *flask* ke kanan dan ke kiri untuk membersihkan sel.
- i. Dibuang SF dalam *flask* ke dalam wadah pembuangan.
- j. Diulangi prosedur (f-i) kembali.
- k. Diambil 5 ml MK menggunakan *sprit* 10 ml
- l. Difilter MK menggunakan membran filter $0,22 \mu\text{m}$ dan dimasukkan ke dalam *flask* secara perlahan pada leher *flask*.
- m. Dihomogenkan MK kemudian diamati kondisi dan jumlah sel secara kualitatif menggunakan mikroskop *inverted*.
- l. *Flask* disemprot menggunakan alkohol 70% kemudian diinkubasi dalam inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%\text{CO}_2$.

4.7.3.6 Pemanenan Sel

Prosedur pemanenan sel adalah sebagai berikut:

- a. Diambil *flask* berisi sel dalam inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%\text{CO}_2$ kemudian diamati kondisi sel menggunakan mikroskop *inverted* (pemanenan sel dilakukan apabila sel konfluen 80%).
- b. Diambil SF, MK dari dalam lemari pendingin 4°C dan dikondisikan pada suhu ruang.
- c. Diambil Tripsin-EDTA dari dalam *freezer* -20°C dan dikondisikan pada suhu ruang.
- d. Disiapkan *sprit* 10 ml, membran filter $0,22\ \mu\text{m}$, *conical tube* 15 ml, pipet ukur 2 ml, *accu jet*, dan wadah pembuangan.
- e. Disemprot (a), (b), (c), dan (d) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.
- f. Dibuang media lama dalam *flask* kedalam wadah pembuangan.
- g. Diambil 2 ml SF menggunakan *sprit* 10 ml.
- h. Difilter SF menggunakan membran filter $0,22\ \mu\text{m}$ dan dimasukkan ke dalam *flask* secara perlahan pada leher *flask*.
- i. Digoyang-goyangkan *flask* ke kanan dan ke kiri untuk membersihkan sel.
- j. Dibuang SF dalam *flask* ke dalam wadah pembuangan.
- f. Diulangi prosedur (g-j) kembali.
- g. Diambil 2 ml Tripsin-EDTA 1x (tripsin 0,25%) menggunakan *sprit* 10 ml.
- h. Difilter Tripsin-EDTA menggunakan membran filter $0,22\ \mu\text{m}$ dan dimasukkan ke dalam *flask* secara perlahan pada leher *flask*.
- i. Diinkubasi *flask* (h) dalam inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%\text{CO}_2$ selama 5 menit.
- j. Diamati kondisi sel menggunakan mikroskop *inverted*.

- k. Diresuspensikan sel dengan cara *pipetting* menggunakan pipet ukur dan *accu jet* hingga sel terlepas satu sama lain.
- l. Diambil 5 ml MK menggunakan *sprit* 10 ml.
- m. Difilter MK menggunakan membran filter 0,22 μm dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 ml.
- n. Dimasukkan sel kedalam *conical tube* 15 ml (m) dan dihomogenkan.
- o. Disentrifugasi sel (n) dengan kecepatan 800 rpm selama 8 menit.
- p. Dibuang supernatan kedalam wadah pembuangan.
- q. Diambil MK ad 1 ml menggunakan *sprit* 10 ml dan dimasukkan kedalam *conical tube* (p) dengan difilter menggunakan membran filter 0,22 μm .
- r. Diresuspensi pellet sel dengan cara *pipetting* menggunakan pipet ukur dan *accu jet* hingga homogen.

4.7.3.7 Perhitungan Sel

Prosedur perhitungan sel adalah sebagai berikut:

- a. Dilakukan pemanenan sel sesuai protokol pemanenan sel.
- b. Disiapkan mikropipet, tip kuning, hemasitometer, dan *mikro tube*.
- c. Disemprot (b) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.
- d. Diambil 10 μl panen sel menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam *mikro tube*.
- e. Diambil 10 μl *Tripan-blue* menggunakan mikropipet dan ditambahkan ke dalam *mikro tube* (d) kemudian dihomogenkan.
- f. Diambil 10 μl (e) menggunakan mikropipet dan dipipetkan ke hemasitometer.

g. Dihitung jumlah sel menggunakan mikroskop *inverted* dan *counter*. Sel yang gelap (sel mati) dan sel yang berada diluar batas sebelah atas dan kanan tidak dihitung. Sel dibatas kiri dan bawah dihitung.

h. Dihitung jumlah sel dalam 4 kamar hemasitometer menggunakan rumus dibawah ini.

$$\text{Jumlah sel terhitung/ml} = \frac{\text{Jumlah sel kamar A+B+C+D}}{4} \times 10^4 \times 2$$

i. Dihitung jumlah total sel yang diperlukan untuk menanam sel pada *plate* 96 sumuran.

j. Dihitung volume panen sel yang diperlukan menggunakan rumus dibawah ini.

$$\text{Volume panen sel yang dibutuhkan} = \frac{\text{Jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{Jumlah sel terhitung/ml}}$$

k. Diambil panen sel sesuai volume yang dibutuhkan menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 ml.

l. Diambil MK ad total volume yang diperlukan menggunakan *sprit* 10 ml. Perhitungan volume MK yang dibutuhkan adalah setiap sumuran akan diisi dengan 100 μl sel, maka total volume yang dibutuhkan untuk menanam sel adalah 100 μl x 100 sumuran = 10 ml.

m. Difilter MK menggunakan membran filter 0,22 μm dan dimasukkan kedalam *conical tube* 15 ml (k) kemudian dihomogenkan.

4.7.3.8 Subkultur Sel

Prosedur subkultur sel adalah sebagai berikut:

- Dilakukan pemanenan sel sesuai protokol pemanenan sel.
- Diambil MK dari lemari pendingin 4°C dan dikondisikan pada suhu ruang.

- c. Disiapkan *sprit* 10 ml, membran filter 0,22 μm , *flask*, mikropipet, dan tip kuning.
- d. Disemprot (b) dan (c) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.
- e. Diambil 8 ml MK menggunakan *sprit* 10 ml.
- f. Difilter MK menggunakan membran filter 0,22 μm dan dimasukkan ke dalam *flask*.
- g. Diambil 200 μl sel menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam *flask* (f).
- h. Dihomogenkan sel dan diamati menggunakan mikroskop *inverted*.
- i. Diberi label *flask* berupa nama sel, jumlah pasase, tanggal subkultur, dan nama peneliti. *Flask* dapat digunakan maksimal 3x pemakaian.
- j. Disemprot alkohol 70% *flask* dan diinkubasi dalam inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%$ CO_2 .

4.7.3.9 Cryopreservation

Prosedur *cryopreservation* adalah sebagai berikut:

- a. Dilakukan pemanenan sel sesuai protokol pemanenan sel.
- b. Diambil MK dari lemari pendingin 4°C dan dikondisikan pada suhu ruang.
- c. Disiapkan *cryo tube*, *sprit* 10 ml, membran filter 0,22 μm , pipet ukur 2 ml, *accu jet*, *conical tube* 15 ml, DMSO, dan wadah pembuangan.
- d. Disemprot (b) dan (c) menggunakan alkohol 70% kemudian dimasukkan ke dalam LAF.
- e. Diambil 1 ml DMSO menggunakan *sprit* 10 ml.
- f. Difilter DMSO menggunakan membran filter 0,22 μm dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 ml.

- g. Diambil MK menggunakan *sprit* 10 ml.
- h. Difilter MK menggunakan membran filter 0,22 μm dan ditambahkan ke dalam *conical tube* 15 ml (f) ad 10 ml kemudian dihomogenkan.
- i. Disentrifugasi sel dengan kecepatan 800 rpm selama 8 menit.
- j. Dibuang supernatan (i) ke dalam wadah pembuangan.
- k. Diambil 1,5 ml media *cryo* menggunakan *sprit* 10 ml.
- l. Difilter media *cryo* menggunakan membran filter 0,22 μm dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 ml (j).
- m. Diresuspensikan sel dengan cara *pipetting* menggunakan pipet ukur dan *accu jet* hingga homogen.
- n. Dituang sel kedalam *cryo tube*.
- o. Diberi label *cryo tube* berupa nama sel, jumlah pasase, tanggal *cryopreservation*, dan nama peneliti.
- p. Disimpan *cryo tube* ke dalam *Mr. Frosty* pada suhu -80°C .

4.7.3.10 Preparasi Ekstrak pada Kultur Sel

Prosedur preparasi ekstrak pada kultur sel adalah sebagai berikut:

- a. Dibuat 7 seri konsentrasi ekstrak rumput lidah ular dan ekstrak sirsak 100-1000 $\mu\text{g/ml}$ (ppm) dengan rumus:

$$f = \sqrt[n-1]{(Dt/Dr)}$$

Keterangan:

- n = banyaknya seri konsentrasi
- Dt = konsentrasi tertinggi
- Dr = konsentrasi terendah
- b. Ditimbang 5 mg ekstrak dalam *mikro tube* menggunakan neraca analitik.

- c. Dilarutkan ekstrak menggunakan DMSO 10-20x (50-100 μ l) dengan di *vortex*.
- d. Ditambahkan MK ad 1 ml dalam *mikro tube* (c) kemudian di *vortex* ad larut.
- e. Dilakukan pengenceran pada konsentrasi tertinggi dalam *conical tube* 15 ml.
- f. Difilter ekstrak (e) menggunakan membran filter 0,22 μ m dalam LAF dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 ml steril.
- g. dilakukan pengenceran 6 seri konsentrasi dalam *conical tube* 15 ml steril.
- h. Disimpan ekstrak dalam lemari pendingin 4°C.

4.7.4 Penentuan IC₅₀ menggunakan Uji MTT

Prosedur penentuan IC₅₀ menggunakan uji MTT adalah sebagai berikut:

- a. Ditimbang 50 mg serbuk MTT menggunakan neraca analitik.
- b. Dimasukkan serbuk MTT dalam *conical tube* 15 ml.
- c. Ditambahkan PBS ad 10 ml ke dalam *conical tube* 15 ml (b).
- d. Ditutup *conical tube* (c) dengan aluminium foil.
- e. Dilarutkan (d) dengan cara di *vortex*.
- f. Difilter larutan stok MTT menggunakan membran filter 0,22 μ m dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 ml steril.
- g. Ditutup *conical tube* (f) dengan aluminium foil dan diberi label larutan stok MTT, tanggal pembuatan, dan nama peneliti.
- h. Diambil 1 ml larutan stok MTT menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 ml.
- i. Diambil 9 ml media RPMI menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam *conical tube* (h) kemudian dihomogenkan.

- j. Diambil media dalam sumuran *well-plate* menggunakan *sprit* 10 ml dan dibuang dalam wadah pembuangan.
- k. Diambil 100 μ l larutan MTT menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam sumuran *well-plate*.
- l. Disemprot *well-plate* menggunakan alkohol 70% dan diinkubasi selama 4 jam pada inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$.
- m. Diamati sel menggunakan mikroskop *inverted*.
- n. Diambil larutan MTT dalam *well-plate* menggunakan *sprit* 10 ml dan dibuang dalam wadah pembuangan.
- o. Diambil 100 μ l DMSO menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam sumuran *well-plate*.
- p. Disemprot *well-plate* menggunakan alkohol 70% dan diinkubasi selama 30 menit pada inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$.
- q. Dibaca absorbansi menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 570 nm.
- r. Dihitung % viabilitas sel menggunakan rumus dibawah ini.

$$\% \text{ viabilitas sel} = \frac{\bar{x} \text{ absorbansi kontrol} - \bar{x} \text{ absorbansi sampel}}{\bar{x} \text{ absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

4.7.5 Uji Sitotoksik Kombinasi Kemoterapi

Prosedur uji sitotoksik kombinasi kemoterapi adalah sebagai berikut:

- a. Dilakukan pemanenan sel sesuai dengan protokol pemanenan sel.
- b. Dilakukan perhitungan jumlah sel yang dibutuhkan sesuai dengan protokol perhitungan sel.
- c. Diambil 100 μ l sel menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam sumuran *well-plate*.

- d. Disisakan 3 sumuran kosong (tidak diisi sel) untuk kontrol media dan 1 sumuran A1 untuk pembacaan *microplate reader*.
- e. Diamati kondisi sel menggunakan mikroskop *inverted*.
- f. Disemprot *well-plate* menggunakan alkohol 70% dan diinkubasi dalam inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$.
- g. Disiapkan kontrol pelarut sesuai dengan perhitungan dalam konsentrasi ekstrak tertinggi pada *conical tube* 15 ml.
- h. Diambil 100 μl DMSO menggunakan mikropipet dan dimasukkan kedalam *conical tube* 15 ml.
- i. Diambil MK menggunakan *sprit* 10 ml kemudian difilter menggunakan membran filter 0,22 μm dan ditambahkan ke *conical tube* (h) ad 5 ml.
- j. Dihomogenkan (i).
- k. Disiapkan ekstrak sesuai dengan protokol preparasi ekstrak.
- l. Diambil *well-plate* dari inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$.
- m. Diambil media lama dalam sumuran menggunakan *sprit* 10 ml dan dibuang ke dalam wadah pembuangan.
- n. Digunakan desain *well-plate* sebagai berikut.

Plate Uji Sitotoksik Tunggal

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				KONTROL SEL						KONTROL MEDIA		
B	AM konsentrasi 1			HD konsentrasi 1								
C	AM konsentrasi 2			HD konsentrasi 2								
D	AM konsentrasi 3			HD konsentrasi 3								
E	AM konsentrasi 4			HD konsentrasi 4								
F	AM konsentrasi 5			HD konsentrasi 5								
G	AM konsentrasi 6			HD konsentrasi 6								
H	AM konsentrasi 7			HD konsentrasi 7								

Plate Uji Sitotoksik Kombinasi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		KONTROL SEL		AM konsentrasi 1		AM konsentrasi 1+ HD konsentrasi 1-4				AM konsentrasi 3+ HD konsentrasi 1-4		
B		KONTROL MEDIA		AM konsentrasi 2								
C		KONTROL SEL		AM konsentrasi 3								
D				AM konsentrasi 4								
E				HD konsentrasi 1		AM konsentrasi 2+ HD konsentrasi 1-4			AM konsentrasi 4+ HD konsentrasi 1-4			
F				HD konsentrasi 2								
G		HD konsentrasi 3										
H		HD konsentrasi 4										

- Untuk kelompok uji sitotoksik tunggal:

Dimasukkan seri konsentrasi ekstrak Hedyotis Herba (HD) atau ekstrak *Annonae muricatae Folium* (AM) ke dalam sumuran yang berisi sel @100 μ l dengan replikasi 3 kali (triplo).
- Untuk kelompok perlakuan tunggal plate kombinasi:

Dimasukkan seri konsentrasi ekstrak Hedyotis Herba (HD) atau ekstrak *Annonae muricatae Folium* (AM) ke dalam sumuran yang berisi sel @100 μ l dengan replikasi 3 kali (triplo).

- Untuk kelompok perlakuan dua kombinasi pada plate kombinasi:
Dimasukkan seri konsentrasi ekstrak Hedyotis Herba (HD) ke dalam sumuran yang berisi sel @50 μ l dengan replikasi 3 kali (triplo), kemudian ditambahkan seri konsentrasi ekstrak *Annonae muricatae* Folium (AM) untuk kombinasi @50 μ l.
- Untuk kontrol sel:
Ditambahkan MK ke dalam sumuran yang berisi sel @100 μ l dengan replikasi minimal 3 kali (triplo).
- Untuk kontrol media:
Ditambahkan MK ke dalam sumuran yang kosong (tanpa sel) @ 100 μ l dengan replikasi minimal 3 kali (triplo).
- o. Diamati *well-plate* menggunakan mikroskop *inverted*.
- p. Disemprot *well-plate* dengan alkohol 70% dan diinkubasi dalam inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$ selama 24 jam.
- q. Diambil *well-plate* dari dalam inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$ dan diamati kondisi sel menggunakan mikroskop *inverted*.
- r. Diambil larutan perlakuan sebelumnya dalam sumuran *well-plate* menggunakan *sprit* 10 ml dan dibuang ke dalam wadah pembuangan.
- s. Diambil 100 μ l larutan MTT menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam sumuran *well-plate*.
- t. Diinkubasi sel selama 4 jam dalam inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$.
- u. Diamati sel menggunakan mikroskop *inverted*.
- v. Diambil larutan MTT dalam sumuran *well-plate* menggunakan *sprit* 10 ml dan dibuang dalam wadah pembuangan.

- w. Diambil 100 μ l DMSO menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam sumuran *well-plate*.
- x. Diinkubasi sel selama 30 menit dalam inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$.
- y. Dibaca absorbansi menggunakan *ELISA-reader* dengan panjang gelombang 570 nm.
- z. Dihitung prosentase sel hidup akibat perlakuan tunggal dan kombinasi ekstrak.

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol negatif} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Dihitung nilai *combination index* (CI) dan dilakukan interpretasi nilai CI sesuai dengan Tabel 4.1

$$\text{CI} = \frac{\text{D1}}{\text{Dx1}} + \frac{\text{D2}}{\text{Dx2}}$$

Keterangan:

DX: Kombinasi terapi tunggal yang dibutuhkan untuk memberikan efek sebesar efek kombinasi

(D)1, (D)2: Konsentrasi kedua senyawa untuk memberikan efek yang sama.

Tabel 4.1 Interpretasi nilai CI (Bijnsdorp, 2011)

Nilai CI	Interpretasi
< 0,1	efek sinergis sangat kuat
0,1 – 0,3	efek sinergis kuat
0,3 – 0,7	efek sinergis
0,7 – 0,9	efek sinergis ringan – sedang
0,9 – 1,1	mendekati efek aditif
1,1 – 1,45	efek antagonis ringan – sedang
1,45 – 3,3	efek antagonis
> 3,3	efek antagonis kuat – sangat kuat

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Determinasi *Hedyotis diffusa* Willd. dan *Annona muricata* Linn.

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Hedyotis diffusa* Willd. yang didapatkan di daerah Banyuwangi dan *Annona muricata* Linn. yang didapatkan dari Balai Materia Medika (BMM) Kota Batu, Jawa Timur. Sampel tanaman dideterminasi oleh BMM, Kota Batu, Jawa Timur dengan tujuan untuk memastikan kebenaran dari sampel tanaman yang akan digunakan berdasarkan morfologi dari *Hedyotis diffusa* Willd dan *Annonae muricata* Linn yang disesuaikan dengan literatur. Berdasarkan hasil determinasi, didapatkan bahwa tanaman yang digunakan yaitu Hedyotis Herba yang termasuk dalam famili *Rubiaceae* dengan nama spesies *Hedyotis diffusa* WILLD. dan *Annonae muricatae* Folium termasuk dalam famili *Annonaceae* dengan nama spesies *Annona muricata* LINN.

5.2 Hasil Ekstraksi *Hedyotis diffusa* WILLD. dan *Annona muricata* LINN.

Ekstraksi yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 80%. Maserasi dipilih dikarenakan prosedur yang mudah untuk dilakukan, sampel dapat diekstrak dalam jumlah banyak serta dapat digunakan untuk ekstraksi senyawa yang belum diketahui karakteristiknya, seperti senyawa yang tidak tahan panas sehingga senyawa yang terdapat pada sampel tidak rusak. Pelarut yang digunakan adalah etanol 80% dikarenakan etanol memiliki dua gugus yang berbeda, yaitu alkil yang bersifat nonpolar dan hidroksil yang bersifat polar sehingga diharapkan senyawa-senyawa yang memiliki tingkat kepolaran berbeda pada tanaman dapat terekstrak dengan menggunakan etanol.



Ekstrak yang dihasilkan dari proses ekstraksi Hedyotis Herba berwarna cokelat kehitaman dan berbentuk pasta, sedangkan untuk ekstraksi *Annonae muricatae* Folium menghasilkan ekstrak berwarna hijau kehitaman dan berbentuk pasta setelah dilakukan pengeringan menggunakan oven selama \pm 7 hari.

Hedyotis Herba yang digunakan adalah sebanyak 160,04 gram dan pelarut etanol 80% yang digunakan adalah sebanyak 1,6 liter dan diperoleh ekstrak pekat sebanyak 11,64 gram. *Annonae muricatae* Folium dimaserasi adalah sebanyak 200,15 gram dengan menggunakan pelarut etanol 80% sebanyak 2 liter dan ekstrak pekat yang dihasilkan sebanyak 53,02 gram. Berdasarkan hasil perhitungan persen rendemen, didapatkan persen rendemen ekstrak Hedyotis Herba dan *Annonae muricatae* Folium masing-masing sebesar 7,28 % dan 26,49 %.

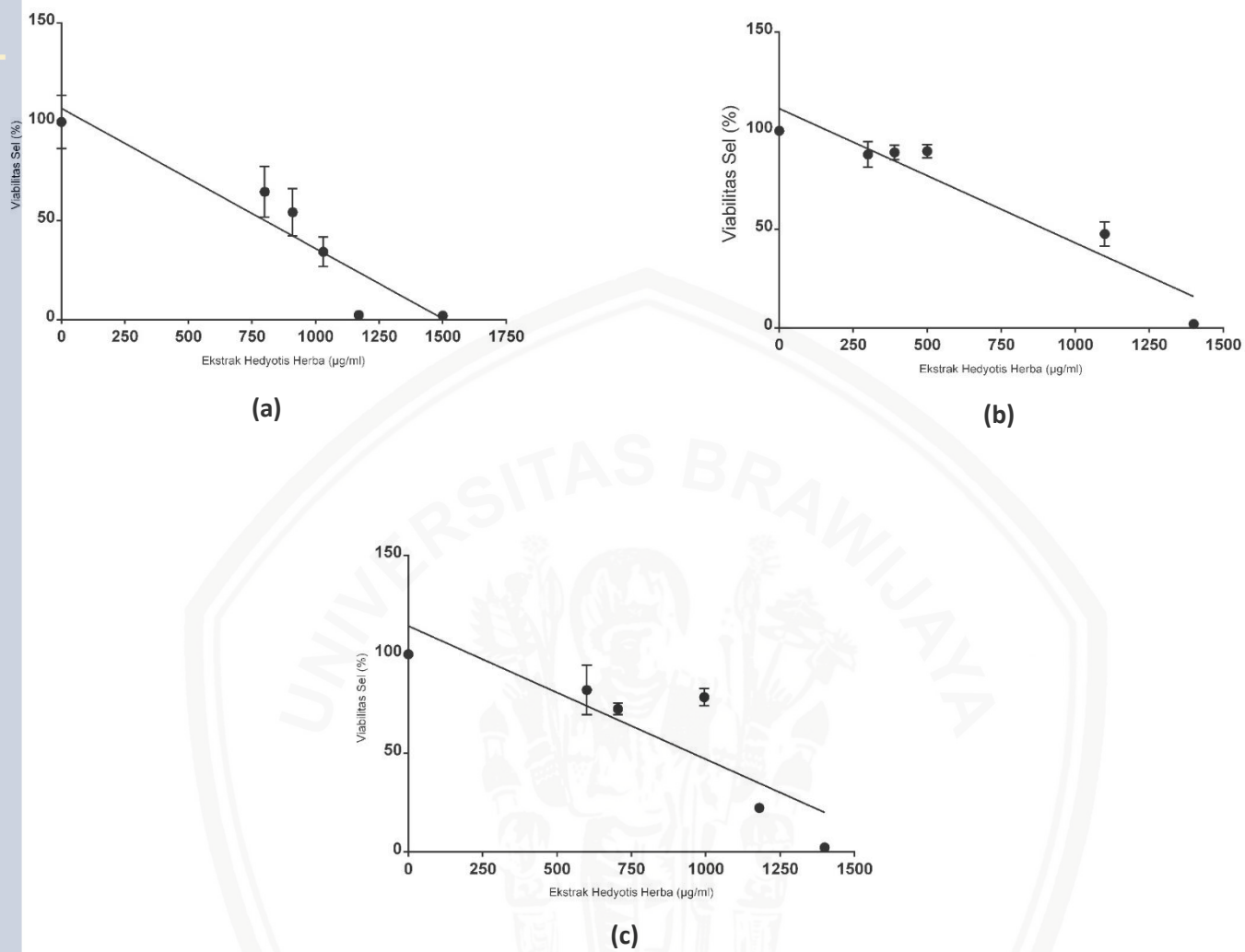
5.3 Hasil Uji Sitotoksik Tunggal

Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. dan *Annonae muricata* Linn. terhadap viabilitas sel MCF-7 maka dilakukan uji sitotoksik tunggal dengan metode MTT assay. Dari metode tersebut didapatkan nilai IC₅₀ masing-masing ekstrak yang diperoleh dari grafik pengaruh pemberian ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. dan *Annonae muricata* Linn. terhadap persentase viabilitas sel. Uji sitotoksik tunggal dilakukan dengan 3 kali replikasi.

Nilai IC₅₀ yang didapatkan pada ekstrak Hedyotis Herba adalah 888 $\mu\text{g/ml}$; 988 $\mu\text{g/ml}$; dan 913 $\mu\text{g/ml}$ sehingga didapatkan rata-rata nilai IC₅₀ adalah $930 \pm 52,20 \mu\text{g/ml}$. Berdasarkan grafik pengaruh pemberian ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. dan *Annonae muricata* Linn. terhadap viabilitas sel MCF-7 maka didapat diamati adanya fenomena *dose dependent manner*, yaitu dengan peningkatan konsentrasi terjadi penurunan viabilitas sel (**Gambar 5.1**). Setelah

pemberian ekstrak, terjadi perubahan morfologi yang dilihat menggunakan mikroskop *inverted* dimana pemberian ekstrak menyebabkan kematian sel dengan ciri-ciri sel mengalami lisis, berbentuk bulat tidak beraturan, mengalami penyusutan dan tidak lagi menempel pada dasar sumuran *well plate* 96. Sel yang mengalami kematian semakin bertambah dengan peningkatan konsentrasi ekstrak Hedyotis Herba.



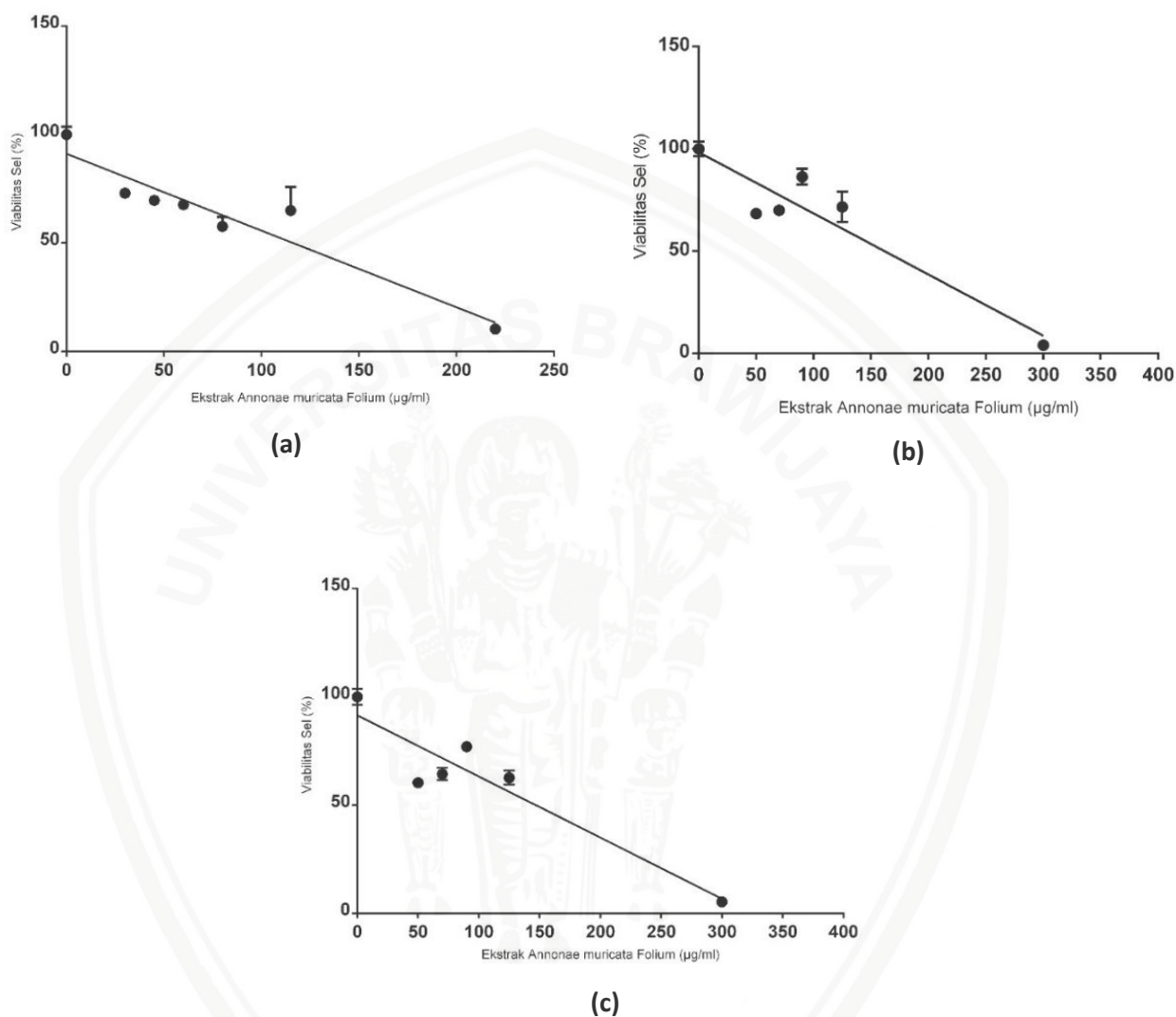


Gambar 5.1. Pengaruh Pemberian Ekstrak Hedyotis Herba terhadap Viabilitas Sel MCF-7.

Keterangan: Pengaruh ekstrak Hedyotis Herba terhadap viabilitas sel MCF-7 diuji dengan menginkubasi 8×10^3 sel dan diberikan berbagai konsentrasi ekstrak Hedyotis Herba selama 24 jam sehingga didapatkan % viabilitas sel yang dihitung dari hasil MTT assay. Absorbansi diukur pada pembacaan ELISA dengan panjang gelombang 570 nm dan hasilnya dinyatakan sebagai % viabilitas sel dalam seri konsentrasi ekstrak yang digunakan. **(a)** Replikasi 1; **(b)** Replikasi 2; **(c)** Replikasi 3. ($p < 0,0001$ dibandingkan dengan kontrol).

Nilai IC_{50} pada *Annonae muricatae* Folium adalah 114 $\mu\text{g/ml}$; 161 $\mu\text{g/ml}$; dan 142 $\mu\text{g/ml}$ dengan nilai rata-rata IC_{50} sebesar $138 \pm 15,95 \mu\text{g/ml}$. Grafik yang diperoleh menunjukkan adanya pengaruh pemberian ekstrak *Annonae muricatae* Folium yaitu fenomena dose dependent manner, dimana terjadi penurunan viabilitas sel sebanding dengan peningkatan konsentrasi ekstrak yang digunakan (**Gambar 5.2**). Selain menggunakan uji MTT, diperoleh hasil perubahan morfologi yang dilihat menggunakan mikroskop inverted dimana terlihat sel hidup yang menempel pada dasar sumuran *well plate* 96, sedangkan sel yang telah terpapar ekstrak mengalami kematian dengan ciri-ciri mengalami penyusutan ukuran dengan bentuk bulat tidak beraturan dan tidak menempel pada sumuran *well plate* 96.

Setelah mengetahui nilai IC_{50} masing-masing ekstrak Hedyotis Herba dan *Annonae muricatae* Folium dari hasil uji sitotoksik tunggal, maka selanjutnya dilakukan uji kombinasi ekstrak Hedyotis Herba dan *Annonae muricatae* Folium.



Gambar 5.2. Pengaruh Pemberian Ekstrak Annonae muricatae Folium terhadap Viabilitas Sel MCF-7.

Keterangan: Pengaruh ekstrak Annonae muricatae Folium terhadap viabilitas sel MCF-7 diuji dengan menginkubasi 8×10^3 sel dan diberikan berbagai konsentrasi ekstrak Annonae muricatae Folium selama 24 jam sehingga didapatkan % viabilitas sel yang dihitung dari hasil MTT assay. Absorbansi diukur menggunakan pembacaan ELISA dengan panjang gelombang 570 nm dan hasilnya dinyatakan sebagai % viabilitas sel dalam seri konsentrasi ekstrak yang digunakan **(a)** Perlakuan 1; **(b)** Perlakuan 2; **(c)** Perlakuan 3. ($p < 0,0001$ dibandingkan dengan kontrol).

5.4 Hasil Uji Sitotoksik Kombinasi

Dilakukan uji sitotoksik kombinasi untuk dapat mengetahui efek dari kombinasi kedua ekstrak terhadap penghambatan pertumbuhan sel MCF-7 yang dilihat dari nilai CI. Dosis yang digunakan pada uji sitotoksik kombinasi adalah 1/8 IC50, 2/8 IC50, 3/8 IC50, dan 4/8 IC50 dari kedua ekstrak sehingga didapatkan dosis pada ekstrak Hedyotis Herba (HD) adalah 116; 232; 349; dan 465 µg/ml, sedangkan pada ekstrak *Annonae muricatae* Folium (AM) didapatkan dosis 17; 35; 52; dan 69 µg/ml.

Nilai CI menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak HD-AM memiliki efek sinergis kuat, efek adiktif ringan-sedang hingga efek antagonis. Melalui perhitungan CI setelah pemberian kombinasi ekstrak HD-AM dapat diketahui dosis kombinasi ekstrak HD-AM yang memiliki efek sinergis Kombinasi ekstrak HD 116 dan 232 µg/ml dengan AM 17 dan 35 µg/ml memiliki efek sinergis kuat hingga efek sinergis dengan nilai CI <0,7, sedangkan pada kombinasi ekstrak HD 349 dan 465 µg/ml dengan AM 52 dan 69 µg/ml memiliki efek sinergis ringan-sedang, efek adiktif hingga antagonis ringan- sedang (CI 0,9-1,45) (**Tabel 5.1**). Kematian sel juga dapat dilihat dari perubahan morfologi yang terjadi dimana terlihat perbedaan sel hidup yang menempel pada dasar sumuran *well plate* 96, sedangkan sel yang telah terpapar ekstrak mengalami kematian dengan ciri-ciri mengalami penyusutan ukuran dengan bentuk bulat tidak beraturan dan tidak menempel pada sumuran *well plate* 96.

Tabel 5.1. Hasil CI Kombinasi Ekstrak HD-AM

	CI	HD ($\mu\text{g/ml}$)			
		116	232	349	465
AM ($\mu\text{g/ml}$)	17	0,313	0,620	0,623	1,042
	35	0,514	0,765	0,847	1,381
	52	0,656	0,988	1,051	1,511
	69	1,162	1,167	1,676	1,248

Keterangan: Interpretasi Nilai CI pada tabel adalah Efek Sinergis Kuat (0,1- 0,3); Efek Sinergis (0,3-0,7); Efek Sinergis Ringan-Sedang (0,7-0,9); Mendekati Adiktif (0,9-1,1); dan Efek Antagonis Ringan-Sedang (1,1-1,45); Efek Antagonis (1,45-3,3).

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

6.1.1 Ekstraksi *Hedyotis diffusa* Willd. dan *Annona muricata* Linn.

Penelitian ini diawali dengan pembuatan ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. dan *Annona muricata* Linn. menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 80%. Prinsip dari metode maserasi yaitu *like dissolve like*, dimana senyawa polar akan larut dalam pelarut polar dan senyawa non-polar akan larut dalam pelarut non-polar. Metode maserasi digunakan karena dapat mengekstrak senyawa dari tanaman yang kemungkinan tidak tahan terhadap panas sehingga kerusakan pada senyawa yang ingin diekstraksi dapat dihindari. Pelarut yang digunakan adalah etanol karena dapat mengekstrak senyawa dalam tanaman baik yang bersifat polar maupun non-polar.

6.1.2 Uji Sitotoksik Tunggal Ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. dan *Annona muricata* Linn.

Uji sitotoksik merupakan uji *in vitro* menggunakan kultur sel untuk mengetahui adanya aktivitas sitotoksik atau anti-proliferasi suatu senyawa. Metode uji sitotoksik yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode MTT, dimana prinsip dari metode ini adalah terjadinya reduksi garam *tetrazolium* MTT oleh sistem reduktase. Pada mitokondria sel yang hidup, MTT akan bereaksi dengan hidrogen yang berasal dari enzim dehidrogenase sehingga mengakibatkan pecahnya cincin *tetrazolium* yang dapat membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Setelah terbentuk kristal formazan maka ditambahkan reagen stopper untuk melarutkan kristal formazan. Reagen

stopper yang digunakan dalam penelitian ini adalah DMSO. DMSO dapat melarutkan kristal formazan dengan cepat dan menghasilkan intensitas warna ungu yang tinggi sehingga dapat diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 570 nm (Septisetyani,2014). Intensitas warna ungu yang terbentuk sebanding dengan jumlah sel yang hidup, sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar maka jumlah sel yang hidup semakin banyak.

6.1.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. Terhadap Viabilitas Sel

Ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd sudah banyak diteliti aktivitas antikankernya melalui uji sitotoksitas. Senyawa yang memiliki aktivitas antikanker pada HD salah satunya adalah senyawa metilantrakuinon. Dalam penelitian ini didapatkan nilai IC₅₀ dari ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. sebesar 930 ± 52 µg/ml. Penelitian yang dilakukan oleh Shi, dkk (2008) menunjukkan bahwa dua senyawa antrakuinon dari *Hedyotis diffusa* Willd. yaitu *2-hydroxy-3-methylantraquinone* dan *1-methoxy-2-hydroxyanthraquinone* memiliki efek menghambat pertumbuhan dari sel kanker *Bcap37* dengan nilai IC₅₀ sebesar 57 µM dan 65 µM. Penelitian lain menunjukkan bahwa ekstrak HD memiliki efek antiproliferatif dan menginduksi terjadinya apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7 dengan nilai IC₅₀ 53,9 µg/mL. Ekstrak HD mampu meningkatkan ekspresi dari gen *supressor* tumor p53 pada sel kanker payudara sehingga terjadi peningkatan apoptosis yang dapat dilihat dari meningkatnya fragmentasi DNA dari sel kanker (Gu,2011).

6.1.4 Pengaruh Pemberian Ekstrak *Annona muricata* Linn. Terhadap Viabilitas Sel

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekstrak sirsak (*Annona muricata* Linn.) memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker. Nilai IC50 dari ekstrak *Annona muricata* Linn. sebesar $138 \pm \mu\text{g/ml}$. Penelitian dari Kadir menunjukkan bahwa ekstrak etanol AM memiliki efek pro-apoptosis pada sel kanker kolon HT29 melalui pembentukan *reactive oxygen species* (ROS), penurunan regulasi anti-apoptosis Bcl-2 dan meningkatkan regulasi pro-apoptosis Bax (Kadir,2014). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Lulus menunjukkan bahwa senyawa *acetogenin* dari ekstrak AM mampu menghambat pertumbuhan dari sel kanker payudara T47D dengan nilai IC50 sebesar $20,25 \mu\text{g/ml}$ (Lulus,2015). Penelitian lain menunjukkan ekstrak AM memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan nilai IC50 sebesar $88,53 \text{ mg/ml}$ dan mampu menurunkan ekspresi dari protein Bcl-2 (Rachmani, 2013).

6.1.5 Efek Kombinasi Ekstrak *Hedyotis diffusa* Willd. dan *Annona muricata* Linn Terhadap Viabilitas Sel

Dari hasil uji sitotoksik kombinasi didapatkan nilai absorbansi serta % viabilitas sel setelah pemberian kombinasi ekstrak sehingga dapat diketahui nilai CI. Nilai CI digunakan untuk mengetahui apakah pemberian kombinasi ekstrak bersifat sinergis, aditif, atau antagonis. Dosis yang digunakan pada uji sitotoksik kombinasi adalah $1/8 \text{ IC}_{50}$, $2/8 \text{ IC}_{50}$, $3/8 \text{ IC}_{50}$, dan $4/8 \text{ IC}_{50}$ dari kedua ekstrak sehingga didapatkan dosis pada ekstrak Hedyotis Herba (HD) adalah 116; 232; 349; dan $465 \mu\text{g/ml}$, sedangkan pada ekstrak *Annonae muricatae* Folium (AM) didapatkan dosis 17; 35; 52; dan $69 \mu\text{g/ml}$.

Berdasarkan nilai CI, kombinasi dari 1/8 IC₅₀ (HD 116 µg/ml dan AM 17 µg/ml) kedua ekstrak memiliki efek sinergis dengan nilai CI 0,31. Penelitian lain melakukan uji aktivitas antikanker dari kombinasi sirsak (*Annona muricata*) dengan metotreksat terhadap sel kanker payudara T47D dan didapatkan hasil bahwa kombinasi dari sirsak dan metotreksat memiliki efek sinergis pada dosis sirsak 35 µg/ml dan dosis metotreksat 2,4 µg/ml dengan nilai CI 0,39 (Nuur Anisa,2018) Reaksi sinergis terjadi ketika obat atau dua senyawa berinteraksi satu sama lain dan menghasilkan efek yang lebih besar dibandingkan saat diberikan tunggal, sedangkan reaksi aditif terjadi ketika efek kombinasi dari dua obat atau senyawa sama dengan apabila diberikan tunggal (Roach,2010). Kombinasi dari ekstrak HD dan AM memiliki efek yang sama dan lebih baik terhadap penurunan viabilitas sel jika dibandingkan dengan pemberian ekstrak tunggal.

6.2 Implikasi Terhadap Bidang Kefarmasian

Saat ini banyak dikembangkan obat yang berasal dari bahan alam sebagai terapi antikanker karena dianggap memiliki efek samping yang minimal. Kombinasi dari ekstrak HD dan AM dapat dikembangkan lebih lanjut karena lebih efektif dibandingkan dengan pemberian ekstrak tunggal karena dapat memberikan efek yang sama atau lebih dari ekstrak tunggal tetapi dengan dosis yang lebih sedikit. Selain itu kedua ekstrak memiliki mekanisme kerja yang berbeda sehingga dapat lebih efektif sebagai antikanker karena dapat bekerja pada beberapa target yang berbeda sehingga lebih efektif dalam mengobati kanker.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan dalam penelitian ini meliputi :

1. Tidak dilakukannya skrining fitokimia kandungan senyawa dalam ekstrak yang digunakan.
2. Tidak dilakukannya uji kadar etanol dalam ekstrak.
3. Tidak dilakukan uji toksisitas ekstrak terhadap sel normal.



BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak *Hedyotis diffusa* dan *Annona muricata* tidak memiliki efek sitotoksik, tetapi mampu menurunkan viabilitas sel kanker payudara MCF-7 melalui jalur proliferasi dengan nilai IC₅₀ untuk ekstrak *Hedyotis diffusa* adalah $930 \pm 52,199$ µg/ml dan untuk ekstrak *Annona muricata* adalah $138 \pm 15,949$ µg/ml.
2. Pemberian kombinasi ekstrak *Hedyotis diffusa* dan *Annona muricata* pada sel kanker payudara MCF-7 memiliki efek sinergis dengan nilai CI 0,31
3. Dosis kombinasi ekstrak *Hedyotis diffusa* dan *Annona muricata* yang mampu memberikan efek sinergis adalah kombinasi dosis *Hedyotis diffusa* 116 µg/ml dan *Annona muricata* 17 µg/ml.

7.2 Saran

Dari penelitian ini maka saran yang dapat diberikan adalah:

1. Perlu dilakukannya uji kualitatif dan uji kuantitatif untuk mengetahui jumlah dan kandungan senyawa apa saja yang terdapat pada ekstrak.
2. Perlu dilakukan uji kadar etanol dalam ekstrak untuk mengetahui toksisitas etanol terhadap sel kanker payudara MCF-7.
3. Perlu dilakukan uji toksisitas ekstrak terhadap sel normal untuk mengetahui apakah ekstrak juga bersifat toksik terhadap sel normal.

DAFTAR PUSTAKA

- Anothaisintawee, T., et.al. 2013. Risk Factors of Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Asia Pacific Journal of Public Health*, 23(2)
- ATCC. 2008. Cell Biology. ATCC® Number: HTB-22TM, Designations: MCF-7, <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB-22&Template=cellBiology>.
- Badrie N and Schauss A G. 2009. Soursop (*Annona muricata* L.): Composition, Nutritional Value, Medicinal Uses, and Toxicology. Watson R and Preedy V. *Bioactive Foods in Promoting Health: Fruits and Vegetables*. Academic Press. pp. 621 – 643.
- Balasubramaniam, S.M., Rotti, S.B., & Vivekanandam, S. 2013. Risk factors of female breast carcinoma: A case control study at Puducherry. *Indian Journal of Cancer*. 50(1):65-70.
- Bijnsdorp I.V., Giovannetti E., Peters G.J. 2011. Analysis of Drug Interactions. In: Cree I. *Cancer Cell Culture. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, 731
- Chalasani, P., Downey, L., & Stopeck, A. T. 2010. Caring for the breast cancer survivor: a guide for primary care physicians. *The American journal of medicine*, 123(6), 489-495.
- Chalasani, P., Marron, M., Roe, D., Clarke, K., Iannone, M., Livingston, R. B., & Stopeck, A. T. 2015. A phase I clinical trial of bavituximab and paclitaxel in patients with HER2 negative metastatic breast cancer. *Cancer medicine*, 4(7), 1051-1059.

- Chen LW, Lin J, Chen W and Zhang WP. 2005. Effect of Chinese herbal medicine on patients with primary hepatic carcinoma in III stage during perioperational period: a report of 42 cases. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 25:832–834.
- Chen, X., Cao, Z., Chen, T., Zhang, Y., Liu, Z., Su, Y., Du, J. 2012. Water extract of *Hedyotis Diffusa* Willd suppresses proliferation of human HepG2 cells and potentiates the anticancer efficacy of low-dose 5-fluorouracil by inhibiting the CDK2-E2F1 pathway. *Oncology Reports*, 28, 742-748.
- Cho, W.S. 2011. Evidence-based Anticancer Materia Medica. Berlin, Springer.
- Deng C. 2006. BRCA1: Cell Cycle Checkpoint, Genetic Instability, DNA Damage Response and Cancer Evolution. *Nucleic Acids Research*, 34 (5).
- Gajalakshmi, S., Vijayalakshmi, S., & Devi Rajeswari, V. 2012. Phytochemical and pharmacological properties of *Annona muricata*: a review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 3-6
- Gu, G., Barone, I., Gelsomino, L., Giordano, C., Bonofiglio, D., Statti, G., Menichini, F., Catalano, S. and Andò, S. 2012. *Oldenlandia diffusa* extracts exert antiproliferative and apoptotic effects on human breast cancer cells through ER α /Sp1-mediated p53 activation. *Journal of Cell Physiology*, 227: 3363-3372.
- Indrati R. 2005. Faktor-Faktor Risiko Yang Berpengaruh Terhadap Kejadian Kanker Payudara Wanita (Studi Kasus Di Rumah Sakit Dokter Kariadi Semarang). Semarang: Program Pascasarjana, Universitas Diponegoro.
- Kadir Habsah Abdul, Soheil Zorofchian Moghadamtousi, Hamed Karimian, Elham Rouhollahi, Mohammadjavad Paydar, Mehran Fadaeinasab. 2014.

Annona muricata leaves induce G1 cell cycle arrest and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in human HCT-116 and HT-29 colon cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 156: 277-289

Kelsey J, Gammon M, John E. 2003. Reproductive Factors and Breast Cancer. *Epidemiol Rev* 15: 36-47.

Lin J, Chen Y, Wei L, Chen X, Xu W, Hong Z, Sferra TJ and Peng J. 2011. *Hedyotis diffusa* Willd extract induces apoptosis via activation of the mitochondrion-dependent pathway in human colon carcinoma cells. *International Journal of Oncology*. 37:1331–1338.

Lin J, Wei L, Xu W, Hong Z, Liu X and Peng J. 2010. Effect of *Hedyotis Diffusa* Willd extract on tumor angiogenesis. *Molecular Medicine Reports*. 4:1283–1288. 2011.

Lulus Megawati. 2015. *Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Biji Sirsak (Annona Muricata Linn.) Terhadap Beberapa Sel Kanker Manusia Secara in Vitro*. Skripsi Thesis, Universitas Airlangga.

Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobson, L. B., Nichols, D. E., & McLaughlin, J. L. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medicin.*, 45, 31–34. 136.

Nuur Anisa Putri, Erika dan, Dr. Haryoto, M.Sc. 2018. *Uji Aktivitas Antikanker Kombinasi Ekstrak Etanol Umbi Bawang Dayak (Eleutherine Americana Merr.) Dan Biji Sirsak (Annona Muricata) Dengan Metotreksat Terhadap Sel T47d*. Skripsi thesis, Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Rachmani, E. P. N., Suhesti, T. S., Widiastuti, R., & Adityono, A. 2013. Cytotoxic Effects of Methanol Extracts of Soursop Leaves (*Annona muricata*) on

MCF-7 Cell Line and Its Effect on Expression of bcl-2. In *ASEAN/Asian Academic Society International Conference Proceeding Series*.

- Ramli, Muchlis. 2003. Management of Breast Cancer, dalam Kumpulan Naskah Ilmiah Mukhtar VI PERABOI, Semarang
- Reiser, M. J., Fang, X. P., Rupprecht, J. K., Hui, Y. H., Smith, D. L., & McLaughlin, J. L. 2010. Bioactive single-ring acetogenins from seed extracts of *Annona muricata*. *Planta Medicine.*, 59: 91–92.
- Rieser, M. J., Kozlowski, J. F., Wood, K. V., & McLaughlin, J. L. 1991. On the mode of baker's yeast reduction of enantiomeric 4-acyl butanolides. *Tetrahedron Letter*, 32, 1137. 137.
- Roach, Sally S. 2010. *Introductory Clinical Pharmacology*. 7th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
- Saika K, Sobu T. 2009. Epidemiology of Breast Cancer in Japan and the US. *Japan Medical Association Journal*, 52(1):39-44
- Schmidt, Barbara et al. 2008. A natural history of botanical therapeutics, *Metabolism - Clinical and Experimental*. 57: S3 - S9
- Septisetyani, Endah Puji, dkk. 2014. Optimization Of Sodium Dodecyl Sulphate As A Formazan Solvent And Comparison Of 3-(4,-5-Dimethylthiazo-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Assay With Wst-1 Assay In MCF-7 Cells. *Indonesian Journal of Pharmacy*, [S.L.], P. 245
- Shi, Y., Wang, C. H., & Gong, X. G. 2008. Apoptosis-inducing effects of two anthraquinones from *Hedyotis diffusa* WILLD. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(6), 1075-1078.
- Stephen S, Falkenberry, Robert D Legare. 2002. Risk Factor for Breast Cancer, *Obstetrics and Gynecology Clinics*, 29(1)

- Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Johny Ria Hutapea. 1991. Inventaris Tanaman Obat Indonesia I.
- Taylor, L. 2002. Graviola (*Annona muricata*). In Herbal Secrets of the Rainforest 2nd ed. Roseville, CA: Prima Publishing
- Tjindarbumi, D. 2002. Deteksi dini Kanker Payudara dan Penanggulangannya, dalam Muchlis Ramli H, Deteksi Dini Kanker. Jakarta: Balai Penerbit FK UI.
- Widowati, L., & Mudahar, H. 2009. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 50% Umbi Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lood Bi) terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 In Vitro. *Jurnal Media Litbang Kesehatan*, 19, 3–8.
- William F. R., & Christopher. 2001. Obstetri dan Ginekologi. Jakarta: Widya Medika.
- World Health Organization. 2012. The World Health Organization's Fight Against Cancer: Strategies That Prevent, Cure and Care. (<http://www.who.int/cancer/modules>).
- Yu-Min Koa, Tung-Ying Wub, Yang-Chang Wub, FangRongChangb, Jinn-Yuh Guhcd, Lea-Yea Chuange. 2011. Annonacin induces cell cycle-dependent growth arrest and apoptosis in estrogen receptor related pathways in MCF-7 cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 137. 1283-1290.