

## Efek Antikanker Nanopartikel Alginat Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) pada Kultur Sel Kanker Hepar (HepG2)

Adila Putri Ramandhita\*, Lelly Yuniarti, Listya Hanum

Prodi Pendidikan Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Bandung, Indonesia.

\*adilaramandhita@gmail.com, lely.yuniarti@gmail.com, hanumlist@gmail.com

**Abstract.** Liver cancer is the second leading cause of cancer death globally in 2020. One of the treatment options for liver cancer is chemotherapy. Chemotherapy for liver cancer still has many side effects and high incidence of resistance. One of the efforts to overcome this problem is the development of phytopharmaceuticals. Soursop leaf extract (*Annona muricata* L.) has been studied and showed various anticancer effects such as cytotoxicity, induction of apoptosis, necrosis, and inhibition of proliferation. Herbal extracts are being developed in nanoparticle preparations because they can increase bioavailability. The purpose of this study was to examine the anticancer effect of alginate nanoparticles (NP) ethanol extract of soursop leaf (*Annona muricata* L.) on HepG2 liver cancer cell cultures. This study is an experimental study in vitro on HepG2 liver cancer cell cultures. Cytotoxicity test was carried out using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay. The IC<sub>50</sub> value was obtained by probit regression analysis using software SPSS. The results showed that the IC<sub>50</sub> NP alginate of soursop leaf ethanol extract was 14.5 g/mL. In conclusion, NP alginate ethanolic extract of soursop leaves has a high anticancer effect on HepG2 liver cancer cell cultures. The anticancer effect can be caused by the content of annonaceous acetogenin (AGE) and flavonoids.

**Keywords:** *Anticancer, Soursop, Liver Cancer, Nanoparticle.*

**Abstrak.** Kanker hepar merupakan penyebab kematian kanker terbanyak kedua secara global pada tahun 2020. Salah satu pilihan terapi kanker hepar adalah kemoterapi. Kemoterapi untuk kanker hepar masih memiliki banyak efek samping dan kejadian resistensi yang tinggi. Salah satu upaya mengatasi masalah tersebut adalah dengan pengembangan fitofarmaka. Ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) telah diteliti dan menunjukkan berbagai efek antikanker seperti sitotoksitas, induksi apoptosis, nekrosis, dan penghambatan proliferasi. Ekstrak herbal sedang dikembangkan dalam sediaan nanopartikel karena dapat meningkatkan bioavailabilitas. Tujuan penelitian ini adalah menguji efek antikanker nanopartikel (NP) alginat ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap kultur sel kanker hepar HepG2. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental in vitro terhadap kultur sel kanker hepar HepG2. Uji sitotoksitas dilakukan menggunakan metode 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromida (MTT) assay. Nilai IC<sub>50</sub> didapatkan dengan analisis regresi probit menggunakan software SPSS. Hasil penelitian menunjukkan IC<sub>50</sub> NP alginat ekstrak etanol daun sirsak sebesar 14,5 µg/mL. Simpulan, NP alginat ekstrak etanol daun sirsak memiliki efek antikanker tinggi pada kultur sel kanker hepar HepG2. Efek antikanker tersebut dapat disebabkan oleh kandungan annonaceous acetogenin (AGE) dan flavonoid.

**Kata Kunci:** *Antikanker, Kanker Hepar, Nanopartikel, Sirsak.*

## A. Pendahuluan

Kanker hepar adalah sekelompok keganasan yang heterogen secara patologis, kelompok ini terdiri dari *hepatocellular carcinoma* (HCC), *intrahepatic cholangiocarcinoma* (iCCA), neoplasma kistik musinosa, neoplasma empedu papiler intraduktal, hepatoblastoma pada anak-anak, angiosarkoma, dan jenis lainnya, dengan etiologi dasar dan mekanisme karsinogenik yang berbeda. *Hepatocellular carcinoma* dan iCCA merupakan jenis kanker hepar terbanyak.

Insidensi kanker hepar dari tahun 1950 hingga 2015 meningkat hingga 75%. Pada tahun 2020, kanker hepar menempati urutan keenam kasus kanker terbanyak dan urutan kedua penyebab kematian terbanyak akibat kanker di dunia. Kanker hepar menempati urutan keempat kanker terbanyak di Indonesia dengan 21.392 kasus baru dan urutan keempat penyebab kematian terbanyak akibat kanker dengan angka kematian mencapai 20.920 jiwa.

Etiologi utama kanker hepar diantaranya infeksi virus hepatitis B, hepatitis C, konsumsi alkohol, paparan aflatoksin, obesitas, dan beberapa penyakit genetik. Insidensi kanker hepar dan prevalensi infeksi HBV dan HCV sangat tinggi di Asia Timur, Asia Tenggara, dan Afrika. Penyakit keturunan yang dapat meningkatkan resiko terjadi kanker hepar adalah hemokromatosis, defisiensi  $\alpha$ -1-antitripsin, porfiria intermiten akut, dan porfiria cutanea tarda.

Terdapat perubahan beberapa genetik somatik yang ditemukan pada HCC, diantaranya pada gen yang berperan dalam perkembangan kanker (TP53, MYC, dan CTNNB1 [ $\beta$ -catenin]), regulasi siklus sel (CCND1, CDKN2A, dan RB1), stabilitas telomer (TERT), regulasi epigenetik (IDH1 dan IDH2), dan pemodelan ulang kromatin (ARID1, ARID2, MLL, BAP, dan EZH2). Banyak dari mutasi ini mengubah ekspresi atau aktivitas produk gen, menyebabkan pembelahan sel yang tidak teratur yang memicu hepatokarsinogenesis.

Terdapat berbagai aktivitas abnormal yang terjadi pada hepatokarsinogenesis yang menyebabkan regulasi proliferasi sel dan apoptosis terganggu, diantaranya: (1) peningkatan TERT menyebabkan aktivitas telomer meningkat dan gangguan sinyal WNT/ $\beta$ -catenin menyebabkan meningkatnya  $\beta$ -catenin dan menginduksi progresi siklus sel fase G1 menuju S, (2) peningkatan ekspresi NF- $\kappa$ B yang berikatan dengan Cyclin D1 sehingga dan menginduksi progresi siklus sel fase G1 menuju S, dan menghambat aktivitas p53, (3) mutasi pada p53 sehingga terjadinya penurunan P21, BAX, CD95 (Fas), dan PERP sehingga cell cycle arrest dan DNA repair terganggu, (4) dan lain-lain. Salah satu terapi kanker hepar adalah kemoterapi, tetapi kemoterapi memiliki efek samping dan resistensi yang tinggi sehingga efektivitas kemoterapi masih rendah.

Salah satu penelitian yang dikembangkan untuk mengatasi hal tersebut adalah fitofarmaka. Tumbuhan digunakan sebagai dasar dari banyak industri farmasi modern saat ini untuk mengobati berbagai penyakit. Pemanfaatan tumbuhan ini selaras dengan firman Allah pada surat An-Nahl ayat 11, yang berbunyi: “Dengan (air hujan) itu Dia menumbuhkan untuk kamu tanam-tanaman, zaitun, kurma, anggur dan segala macam buah-buahan. Sungguh, pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berpikir.” Ayat tersebut menyebutkan bahwa tumbuhan memiliki banyak manfaat termasuk dalam aspek kesehatan. Substansi alami pada tumbuhan diketahui memiliki potensi antikanker yang lebih tinggi.

Sirsak (*Annona muricata L.*) telah lama digunakan sebagai *herbal medicine* untuk berbagai penyakit, terutama kanker dan infeksi parasit. Sirsak juga berperan sebagai antiarthritis, antidiabetes, antiinflamasi, antioksidan, antihipertensi, dan lain-lain. Ekstrak daun sirsak adalah salah satu bagian sirsak yang telah diteliti dan digunakan untuk pengobatan antikanker. Ekstrak daun sirsak telah menunjukkan berbagai efek antikanker seperti sitotoksitas, induksi apoptosis, nekrosis, dan penghambatan proliferasi. Komponen utama pada ekstrak daun sirsak yang memiliki efek antikanker adalah *annonaceous acetogenin* (AGE) dan flavonoid. Mekanisme AGE diantaranya: (1) sitotoksitas melalui *inhibisi mitochondrial complex 1* sehingga sintesis ATP terganggu, (2) apoptosis melalui procaspase 3,7, dan 9, aktivasi caspase 3,7 dan 9, meningkatkan regulasi BAX, menurunkan regulasi BCL-2, akumulasi ROS dan *endoplasmic reticulum* (ER) stress, (4) penurunan regulasi EGFR sehingga terjadi penurunan NF- $\kappa$ B, sehingga memicu apoptosis yang dimediasi caspase. Ekstrak *A. muricata* yang memiliki banyak aktivitas antikanker diantaranya adalah ekstrak etanol.

Sediaan ekstrak sedang dikembangkan dalam bentuk nanopartikel. Nanopartikel memiliki karakteristik dengan ukuran kecil (1–300 nm). Ukuran tersebut memudahkan nanopartikel untuk ekstravasasi melalui pori-pori endotel pembuluh darah menuju sel kanker sehingga meningkatkan bioavailabilitas. Bahan nanopartikel yang sedang dikembangkan menjadi terapi antikanker adalah polimer, yang dapat diklasifikasikan menjadi polimer sintesis atau alami. Polimer alami, terutama polimer dari organisme laut, umumnya dianggap jauh lebih aman daripada polimer sintesis karena biodegradabilitas dan biokompatibilitasnya. Salah satu biopolimer nanopartikel yang digunakan adalah alginat. Alginat memiliki biodegradabilitas yang baik, toksisitas rendah, dan absorpsi yang tinggi. Penelitian ini bertujuan menguji efek antikanker nanopartikel (NP) alginat ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L.*) terhadap kultur sel kanker hepar HepG2.

## B. Metodologi Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni *in vitro* menggunakan rancangan penelitian *randomize post test only control group design*. Metode uji yang digunakan adalah pemberian sediaan nanopartikel alginat ekstrak etanol daun sirsak pada kultur sel kanker hepar HepG2.

Daun sirsak yang digunakan berasal dari Instalasi Penelitian dan Pengembangan Teknologi Pertanian (IP2TP) Manoko, Lembang. Sebelum dibuat simplisia, daun sirsak dikeringkan pada suhu ruang di udara terbuka sampai kadar airnya sangat rendah. Simplisia yang telah dikeringkan dibuat serbuk halus dan dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% (SNITZ), diaduk, didiamkan selama 24 jam, kemudian disaring. Filtrat diuapkan dengan *vacum rotary evaporator* dalam *waterbath* pada suhu 75°C. Sediaan kental yang dihasilkan dituangkan ke dalam cawan porselen, kemudian dipanaskan dalam *waterbath* pada suhu 60°C sambil terus diaduk hingga menghasilkan ekstrak etanol daun sirsak dalam bentuk pasta.

Sediaan nanopartikel alginat dibuat dengan menambahkan larutan 0,1% natrium alginat sebanyak 15 mL ke dalam 20 mg ekstrak etanol daun sirsak dan dihomogenkan dengan ultrasonik *probe* selama 3 menit. Lalu, campuran tersebut ditambahkan secara *drop by drop* dengan *syringe pump* ke dalam 15 mL CaCl<sub>2</sub> 0,1% dalam waktu 10 menit sambil dihomogenkan menggunakan aerator dan ultrasonik. Larutan tersebut dihomogenkan kembali dengan stirer selama 5 menit, kemudian dilakukan pembacaan ukuran dan zeta potensial partikel menggunakan *particle size analyzer* (PSA).

Sel kanker hepar HepG2 ditumbuhkan di dalam media komplet yang terdiri atas *dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) dengan suspensi 10% *fetal bovine serum* (FBS), fungison 0,5%, dan 1% penisilin- streptomisin. Konsentrasi sel yang digunakan, yaitu 1 x 10<sup>4</sup> sel/mL ke dalam botol kultur sel *flask*, lalu botol kultur budaya sel *flask* diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% selama 24 jam pada suhu 37°C sampai sel subkonfluen.

Pada penelitian ini, jumlah sel yang digunakan adalah 1x10<sup>4</sup> sel/sumuran (1x10<sup>4</sup> sel/100 µL medium komplet) pada 96-well plate, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan konsentrasi CO<sub>2</sub> 5% sampai subkonfluen. Selanjutnya, diberikan berbagai konsentrasi bahan uji dan diinkubasi kembali selama 24 jam pada kondisi yang sama. Setelah itu kultur sel dicuci dengan 100 µL PBS pada setiap sumuran, kemudian ditambah 100 µL larutan MTT (1 mL MTT dalam 10 mL, media kultur) dan diinkubasikan kembali pada suhu 37°C dan CO<sub>2</sub> 5% selama 4 jam. Setelah 4 jam, ditambahkan 100µL *stopper* SDS 10% dalam HCl 0,1 N (untuk melarutkan *purple* formazan). Kemudian dibungkus rapat menggunakan kertas atau *aluminium foil* dibiarkan dalam suhu kamar semalaman. Setelah itu, dilakukan pembacaan absorbansi dengan *microplate* ELISA reader pada panjang gelombang (λ) 595 nm.

Viabilitas sel dihitung dengan persamaan berikut:

$$\text{Viabilitas sel } (\%) = \frac{(A_{\text{perlakuan}} - A_{\text{kontrol media}})}{(A_{\text{kontrol sel}} - A_{\text{kontrol media}})} \times 100\%. \quad A = \text{Absorbansi}$$

Kemudian dihitung dan dianalisis dengan regresi probit menggunakan *software* SPSS untuk menentukan IC<sub>50</sub>.

**Tabel 1.** Interpretasi Nilai IC<sub>50</sub>

| Nilai IC50    | Interpretasi                   |
|---------------|--------------------------------|
| <20 µg/ml     | aktivitas sitotoksik tinggi    |
| 20-100 µg/ml  | aktivitas sitotoksik sedang    |
| 101-500 µg/ml | aktivitas sitotoksik rendah    |
| IC50>500      | tidak ada aktivitas sitotoksik |

Penelitian ini menggunakan sel HepG2 yang telah lama disimpan dan dikembangkan di Laboratorium Parasitologi Universitas Gadjah Mada. Penggunaan sel HepG2 dalam penelitian ini dilakukan sebaik-baiknya untuk kemajuan ilmu pengetahuan, penelitian dan kepentingan masyarakat dengan mempertimbangkan aspek manusia. Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas kedokteran Islam Bandung telah menyetujui penelitian ini dengan nomor persetujuan penelitian kesehatan: 030/KEPK-Unisba/V/2021.

### C. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Nanopartikel alginat ekstrak etanol daun sirsak konsentrasi 50 mg/ 30 mL memiliki rerata ukuran 192,8 nm dan zeta potensial -60,2 mV yang diukur dengan metode *dynamic light scattering* menggunakan alat PSA. Nilai zeta tersebut, negatif atau positif yang tinggi, menunjukkan kestabilan fisik yang baik karena adanya tolakan elektrostatik antara partikel individu.

Uji sitotoksik dilakukan pada serial konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125 µg/mL. Viabilitas sel masing-masing konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil uji sitotoksik menunjukkan nanopartikel alginat ekstrak etanol daun sirsak memiliki IC50 sebesar 14,5 µg/mL. Hasil tersebut menunjukkan aktivitas sitotoksik tinggi terhadap sel kanker HepG2.

**Tabel 2.** Efek Nanopartikel Alginat Ekstrak Daun Sirsak dan Doksorubisin terhadap Sel HepG2

| Dosis µg/mL | Viabilitas (%) |
|-------------|----------------|
| 500         | 21,7           |
| 250         | 21,1           |
| 125         | 14,3           |
| 62,5        | 44,7           |
| 31,25       | 55,0           |
| 15,625      | 49,9           |
| 7,8125      | 47,7           |

Hal ini serupa dengan penelitian Rady dkk. Menyatakan bahwa daun sirsak memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker hepar (HepG2). Komponen bioaktif yang berperan dalam efek diantaranya adalah *annonaceous acetogenins* (AGE). Acetogenin atau *annonaceous acetogenin compound* (AGE) adalah kelompok unik dari metabolit sekunder C-35/C37 yang berasal dari rantai panjang (C-32/C34). Acetogenin biasanya dicirikan oleh kombinasi asam lemak dengan unit 2-propanol pada C-2 yang membentuk *methyl-substituted  $\alpha,\beta$ -unsaturated  $\gamma$ -lactone*. Lebih dari 500 AGE telah diidentifikasi dari berbagai bagian tanaman dalam famili Annonaceae. Komponen AGE tersebut mengganggu sintesis *adenosine tryphosphate* (ATP) dengan menginhibisi *mitochondrial complex 1* yang terlibat dalam fosforilasi oksidatif NADPH. Akibatnya, kebutuhan ATP sel kanker tidak terpenuhi dan menyebabkan apoptosis (Gambar 2.7). *Annocatacin A* merupakan salah satu AGE yang dimurnikan yang menunjukkan sitotoksitas terhadap sel HepG2. *Annonaceous acetogenin compound* (AGE) juga telah diketahui menginduksi sitotoksitas berbagai tipe kanker lainnya seperti paru, *prostate*, *colorectal*, pankreas, leukemia, ginjal, dan oral.

Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa sediaan sirsak juga dapat memicu apoptosis melalui aktivasi procaspase 3,7, dan 9, aktivasi caspase 3,7 dan 9, meningkatkan regulasi BAX, menurunkan regulasi BCL-2, akumulasi ROS dan *endoplasmic reticulum* (ER) stress (Gambar

2.7). Jalur intrinsik atau mitokondria apoptosis dapat diinduksi oleh stres intraseluler seperti kerusakan *deoxyribonucleic acid* (DNA) dan peningkatan ROS yang akan memicu pelepasan *mitochondrial cytochrome c* (Cyt C), lalu membentuk *apoptosome complex* yang terdiri dari Cyt C, *apoptotic protease activating factor*, dan procaspase 3,7 dan 9. Kompleks ini kemudian mengaktifkan caspase 3,7, dan 9. Apoptosis yang dimediasi caspase dicapai melalui pembelahan beberapa protein kunci yang diperlukan untuk fungsi seluler dan kelangsungan hidup, salah satunya adalah poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) sehingga sel mengalami apoptosis (Gambar 2.7). Sedangkan untuk ER stress, hal ini menyebabkan peningkatan ekspresi C/EBP-homologous protein (CHOP) yang memicu aktivasi protein penyebab apoptosis. Penelitian Zorofchian dkk menunjukkan sirsak menginduksi apoptosis melalui distrupsi membran mitokondria, menyebabkan terhentinya siklus sel pada fase G1 pada sel kanker *colon* HT29. Pada sel kanker kolorektal HT-29, ekstrak daun sirsak menginduksi apoptosis melalui akumulasi *reactive oxygen species* (ROS).

Penelitian Rady, dkk. Mengatakan bahwa inhibisi proliferasi sel oleh *A. muricata* dihasilkan oleh AGE diantaranya melibatkan penurunan *epidermal growth factor receptor* (EGFR) yang menyebabkan penurunan regulasi *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase* (PI3K/Akt), RAS, NF-κB, and JAK/STAT. Hal ini mengarah pada penghentian siklus sel dan inhibisi proliferasi.

Selain AGE, flavonoid juga merupakan komponen bioaktif yang memiliki peran dalam aktivitas antikanker melalui apoptosis dengan mekanisme yang tidak jauh berbeda dengan AGE. Flavonoid bekerja sebagai pro-oksidan pada sel kanker. Salah satu mekanismenya adalah menghambat *epidermal growth factor receptor/mitogen activated protein kinase* (EGFR/MAPK) sehingga pertumbuhan sel terhambat. Walaupun berperan sebagai pro-oksidan terhadap sel kanker, flavonoid bekerja sebagai antioksidan pada sel normal. Flavonoid dapat langsung mengikat radikal bebas atau ROS karena adanya gugus hidroksil fenolik. Flavonoid juga meningkatkan enzim antioksidan (lipoxigenase, xantine oxidase, dan lain-lain) dan menurunkan enzim pro-oksidan terhadap sel normal.

Aktivitas antikanker *A. muricata L.* tidak hanya menginduksi apoptosis dan antiproliferasi, tetapi dapat menurunkan migrasi, motilitas dan invasi sel kanker. Penelitian terdahulu menunjukkan setelah sel kanker pankreas FG/COLO357 diberikan ekstrak daun sirsak, motilitas sel kanker tersebut menurun. Ekstrak daun sirsak juga menunjukkan dapat menghambat migrasi dan invasi sel kanker colorectal HT-29 dan HCT-119 secara signifikan.

Efek sitotoksik nanopartikel alginat lebih besar dibanding dengan ekstrak etanol daun sirsak terhadap sel HepG2. Penelitian Liu dkk. Menunjukkan ekstrak etanol daun sirsak memiliki nilai IC<sub>50</sub> sekitar 150 µg/mL terhadap sel kanker hepar HepG2, sedangkan pada penelitian ini nanopartikel alginat ekstrak daun sirsak memiliki IC<sub>50</sub> 14,5 µg/mL. Hasil uji sitotoksitas pada penelitian Qu dkk. Menunjukkan bahwa nanopartikel (AgNP). Nanopartikel kurkumin pada sel kanker payudara 4T1 menunjukkan hasil IC<sub>50</sub> lebih rendah yaitu 38 µg/mL dibandingkan dengan kurkumin bebas (77 µg/mL). Sitotoksitas yang diinduksi NP utamanya dipengaruhi oleh struktural kimiawi NP. Hal-hal lain yang mempengaruhi sitotoksitas NP adalah konsentrasi NP, ukuran, dan sifat permukaan, serta jenis anatomi sel dan asal sel dan waktu paparan sel terhadap NP.

Nanopartikel memicu internalisasi seluler yang lebih efisien dan mudah. Hal ini diantaranya karena ukurannya yang kecil memudahkan internalisasi seluler melalui pori-pori endotel untuk mencapai sel kanker. Internalisasi seluler juga menjadi lebih cepat karena muatan pada permukaan nanopartikel yang menyebabkan ikatan elektrostatis dengan sel kanker lebih kuat. Karakteristik ini menyebabkan nanopartikel memiliki efek sitotoksik yang lebih tinggi.

#### D. Kesimpulan

Simpulan penelitian ini adalah nanopartikel alginat ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) bersifat antikanker tinggi pada kultur sel kanker hepar HepG2.

#### Acknowledge

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Farmasi Universitas Islam Indonesia,

Laboratorium Parasitologi Universitas Gadjah Mada, Laboratorium Fakultas Kedokteran, dan Laboratorium Farmasi Universitas Islam Bandung. Penelitian ini didanai penuh oleh Unit Pengabdian Kepada Masyarakat (UPPM) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung yang telah mendukung pendanaan penelitian ini (kontrak hibah PDU Nomor: 035/UPPM/SPPP-DS/III/2021).

### Daftar Pustaka

- [1] World Health Organization. World Cancer Report. Globocan 2020. 2020;419:1–2.
- [2] Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2018;391(10127):1301–14.
- [3] Sia D, Villanueva A, Friedman SL, Llovet JM. Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. *Gastroenterology*. 2017;152(4):745–61.
- [4] International Agency for Research on Cancer (IARC). Indonesia - Global Cancer Observatory. Globocan. 2020;858:1–2.
- [5] International Agency for Research on Cancer (IARC). Indonesia - Global Cancer Observatory. Globocan. 2020;858:1–2. Globocan 2020. 2020;419:1–2.
- [6] Donehower LA, Soussi T, Korkut A, Liu Y, Schultz A, Cardenas M, et al. Integrated Analysis of TP53 Gene and Pathway Alterations in The Cancer Genome Atlas. 2019;28(5):1370-1384.e5.
- [7] Wu M-Y, Yiang G-T, Cheng P-W, Chu P-Y, Li C-J. Molecular Targets in Hepatocarcinogenesis and Implications for Therapy. *J Clin Med*. 2018;7(8):213.
- [8] Nusse R, Clevers H. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*. 2017;169(6):985–99.
- [9] American Cancer Society. Cervical Cancer Early Detection , Diagnosis , and Staging Can Cervical Cancer Be Found Early. *Am Cancer Soc*. 2019;1–32.
- [10] Yusuf M. Sejarah peradaban Islam di Indonesia. 2006;312.
- [11] Pieme AA, Kumar GG, Dongmo SS, Moukette MM, Boyoum FF, Ngogang YY, et al. Antiproliferative activity and induction of apoptosis by *Annona muricata* (Annonaceae) extract on human cancer cells. *BMC Complement Altern Med*. 2014. Dec 24;14(1).
- [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 [Internet]*. 2019 [cited 2021 Jan 30];2019:7607031.
- [13] Rady I, Bloch MB, Chamcheu RCN, Banang Mbeumi S, Anwar MR, Mohamed H, et al. Anticancer Properties of *Graviola* (*Annona muricata*): A Comprehensive Mechanistic Review. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018.
- [14] Liu N, Yang HL, Wang P, Lu YC, Yang YJ, Wang L, et al. Functional proteomic analysis reveals that the ethanol extract of *Annona muricata* L. induces liver cancer cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress pathway. *J Ethnopharmacol*. 2016;189:210–7.
- [15] Moghadamtousi SZ, Fadaeinasab M, Nikzad S, Mohan G, Ali HM, Kadir HA. *Annona muricata* (Annonaceae): A review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *Int J Mol Sci*. 2015;16(7):15625–58.
- [16] Rady I, Bloch MB, Chamcheu RCN, Banang Mbeumi S, Anwar MR, Mohamed H, et al. Anticancer Properties of *Graviola* (*Annona muricata*): A Comprehensive Mechanistic Review. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018.
- [17] Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J. Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*. 2020;12(2):1–25.
- [18] He L, Shang Z, Liu H, Yuan ZX. Alginate-Based Platforms for Cancer-Targeted Drug Delivery. *Biomed Res Int*. 2020;2020.
- [19] Yin L, Zhong Z. Nanoparticles. *Biomater Sci*. 2020;(Cmc):453–83.
- [20] Kopeckova K, Eckschlager T, Sirc J, Hobzova R, Plch J, Hrabeta J, et al. Nanodrugs used in cancer therapy. *Biomed Pap*. 2019;163(2):122–31.

- [21] Sabapati M, Palei NN, Ashok AK, Molakpogu RB. Solid lipid nanoparticles of *Annona muricata* fruit extract: formulation, optimization and in vitro cytotoxicity studies. *Drug Dev Ind Pharm.* 2019;45(4):577–86.
- [22] Priya M R K, Iyer PR. Antiproliferative effects on tumor cells of the synthesized gold nanoparticles against Hep2 liver cancer cell line. *Egypt Liver J.* 2020;10(1).
- [23] Badmus JA, Oyemomi SA, Adedosu OT, Yekeen TA, Azeez MA, Adebayo EA, et al. Photo-assisted bio-fabrication of silver nanoparticles using *Annona muricata* leaf extract: exploring the antioxidant, anti-diabetic, antimicrobial, and cytotoxic activities. *Heliyon.* 2020;6(11):e05413.
- [24] Joseph E, Singhvi G. Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: A potential nanocarrier [Internet]. *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy.* Elsevier Inc.; 2019. 91–116 p.
- [25] Chaitanya GV, Alexander JS, Babu PP. PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal.* 2010;8(1):31.
- [26] Zorofchian Moghadamtousi S, Karimian H, Rouhollahi E, Paydar M, Fadaeinasab M, Abdul Kadir H. *Annona muricata* leaves induce G1 cell cycle arrest and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in human HCT-116 and HT-29 colon cancer cells. *J Ethnopharmacol.* 2014;156:277–89.
- [27] Qu D, Sun W, Chen Y, Zhou J, Liu C. Synthesis and in vitro antineoplastic evaluation of silver nanoparticles mediated by *Agrimoniae herba* extract. *Int J Nanomedicine.* 2014;9(1):1871–82.
- [28] Huang C, Chen F, Zhang L, Yang Y, Yang X, Pan W. <sup>99m</sup>Tc radiolabeled HA/TPGS-based curcumin-loaded nanoparticle for breast cancer synergistic theranostics: Design, in vitro and in vivo evaluation. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:2987–98.
- [29] Labouta HI, Asgarian N, Rinker K, Cramb DT. Meta-Analysis of Nanoparticle Cytotoxicity via Data-Mining the Literature. *ACS Nano.* 2019;13(2):1583–94.
- [30] Dobrucka R. Biofabrication of platinum nanoparticles using *Fumariae herba* extract and their catalytic properties. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. 2019;26(1):31–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.11.012>
- [31] Bao H, Zhang Q, Xu H, Yan Z. Effects of nanoparticle size on antitumor activity of 10-hydroxycamptothecin-conjugated gold nanoparticles: In vitro and in vivo studies. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:929–40.