



Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Sirsak terhadap Histologi Tumor Payudara Tikus Putih Betina *Sprague Dawley*

Teguh Rinjaya,¹ Muhammad In'am Ilimiawan,² Mardhia Mardhia³

¹Program Studi Kedokteran, ²Departemen Patologi Anatomi, ³Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Pontianak, Kalimantan Barat, Indonesia

ABSTRAK

Kanker payudara merupakan kasus kanker tertinggi pada wanita di seluruh dunia dan penyebab kematian terbesar akibat kanker. Salah satu tanaman yang diketahui dapat bersifat sebagai anti-kanker adalah daun sirsak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun sirsak terhadap histologi sel tumor payudara pada tikus betina galur *Sprague Dawley*. Penelitian eksperimental dengan desain *post-test only control group*. Proses induksi tumor payudara dengan pemberian 7,12 dimetilbenz(α)anthracene (DMBA) dan estrogen. Total subjek penelitian adalah 30 ekor tikus betina galur *Sprague Dawley* yang dibagi menjadi 6 kelompok, yaitu normal, kontrol negatif (DMSO 5%), kontrol positif (*tamoxifen* per oral 50 mg/kgBB/hari), perlakuan I (ekstrak daun sirsak per oral 75 mg/kg/hari), perlakuan II (ekstrak daun sirsak per oral 150 mg/kgBB/hari), dan perlakuan III (ekstrak daun sirsak per oral 300 mg/kgBB/hari); perlakuan diberikan selama 9 hari. Uji statistik *Fischer exact test* menunjukkan tidak terdapat perbedaan gambaran jaringan histologi secara bermakna antar kelompok perlakuan. Ekstrak etanol daun sirsak dosis 300 mg/kgBB/hari tidak memengaruhi histologi tumor payudara.

Kata kunci: 7,12 dimetilbenz(α) anthracene, daun sirsak, tumor payudara

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent cancer and cause of cancer death in women worldwide. Soursop leaf has been known to have anti-cancer properties. This study aimed to determine the effect of soursop leaf ethanol extract on the histology of breast tumor in female Sprague Dawley rats. This is an experimental study with a post-test only control group design. Breast tumor was induced by 7,12 dimethylbenz(α)anthracene (DMBA) and estrogen injection. The total subjects were 30 female rats Sprague Dawley divided into 6 groups: normal, negative control (DMSO 5%), positive control (*tamoxifen* oral 50 mg/kgBW/day), treatment I (soursop leaf extract oral 75 mg/kgBW/day), treatment II (soursop leaf extract oral 150 mg/kgBW/day), and treatment III (soursop leaf extract oral 300 mg/kgBW/day). Each treatment was for 9 days. Analysis with Fischer exact test resulted in no significant difference in histological characteristics among the treatment groups. Ethanol extract of soursop leaves at a dose of 300 mg/kgBW/day did not affect the histology of breast tumor. **Teguh Rinjaya, Muhammad In'am Ilimiawan, Mardhia Mardhia. The Effects of Soursop Leaf Ethanol Extract on the Histology of Breast Tumor in Female Sprague Dawley Rats**

Keywords: 7,12 dimethylbenz (α) anthracene, breast tumor, soursop leaves



Cermin Dunia Kedokteran is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

PENDAHULUAN

Kanker payudara adalah kanker paling banyak pada wanita di seluruh dunia, terjadi pada sekitar 2,1 juta wanita setiap tahun dan merupakan penyebab kematian terbesar terkait kanker pada wanita. Pada tahun 2018, diperkirakan 627.000 wanita meninggal karena kanker payudara, yaitu sekitar 15% dari semua penyebab kematian akibat kanker pada wanita.¹

Kanker payudara dimulai dengan lesi premaligna ditandai secara mikroskopis oleh

aktivitas proliferasi abnormal pada sistem duktus (duktal) atau di kelenjar (lobular), tanpa tanda-tanda menembus membran basal; infiltrasi terjadi jika sel tersebut menembus membran basal. Biasanya kelenjar memiliki dua lapisan sel. Adanya tiga atau lebih lapisan sel merupakan tanda aktivitas proliferasi abnormal. Lesi dapat diklasifikasikan menurut proliferasi, atipia seluler, dan arsitektur jaringan, di antaranya: hiperplasia epitel lobular dan duktus tanpa atipia, hiperplasia epitel lobular dan duktus dengan atipia, karsinoma lobular *in situ* (LCIS), dan karsinoma duktal *in situ*

(DCIS) *grade* 1-3.^{2,3}

Kesintasan penderita kanker payudara bervariasi di seluruh dunia, saat ini umumnya mengalami peningkatan. Kesintasan meningkat karena kanker payudara didiagnosis lebih dini di negara-negara di mana penduduknya memiliki akses medis yang lebih baik, dan strategi pengobatannya lebih baik. Di banyak negara dengan perawatan medis yang lebih maju, kesintasan lima tahun penderita kanker payudara tahap awal adalah 80-90%, dan turun menjadi 24%

Alamat Korespondensi email: teguhrinjaya@student.untan.ac.id



HASIL PENELITIAN



untuk kanker payudara yang didiagnosis pada stadium yang lebih lanjut. Insiden tertinggi kanker payudara di Amerika Utara dan Oceania; dan insiden terendah di Asia dan Afrika.⁴

Daun sirsak (*Annona muricata*) diketahui memiliki lebih dari 100 senyawa asetogenin yang memiliki aktivitas anti-tumor.⁵ Studi *in vitro* menunjukkan bahwa daun sirsak memiliki aktivitas anti-kanker terhadap kultur sel kanker payudara T47D dan diperkirakan dapat memiliki aktivitas anti-kanker secara *in vivo*. Pemberian ekstrak etanol daun sirsak secara per oral dapat memicu kematian sel melalui mekanisme apoptosis. Mekanisme apoptosis melalui beberapa cara, yaitu penghambatan *glucose transporter* (GLUT) pada membran plasma, menghambat kompleks 1 mitokondria, dan menghambat NADH pada enzim *ubiquinone oxidoreductase*. Asetogenin pada daun sirsak dapat digunakan untuk melawan kanker dengan menghambat ATP (adenosin trifosfat) yang memberi energi pada sel kanker, sehingga berdampak menghambat mitosis atau pembelahan sel kanker.⁶

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak etanol daun sirsak terhadap histologi sel tumor payudara pada tikus putih galur *Sprague Dawley*.

METODE

Jenis Penelitian

Penelitian eksperimental laboratorium metode rancangan acak dengan desain *post-test only control group*. Penelitian dilakukan di Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura pada bulan Desember 2018 hingga Oktober 2019.

Subjek Penelitian

Total subjek penelitian adalah 30 ekor tikus putih galur *Sprague-Dawley* sehat yang dibagi menjadi 6 kelompok. Kelompok normal diberi makan dan minum standar, kelompok kontrol negatif diberi dimetilsulfoksida (DMSO) 5% per oral/hari, kelompok kontrol positif diberi *tamoxifen* per oral 50 mg/kgBB/hari, kelompok perlakuan I (ekstrak daun sirsak 75 mg/kgBB per oral/hari), kelompok perlakuan II (ekstrak daun sirsak 150 mg/kgBB per oral/hari), dan kelompok perlakuan III (ekstrak daun sirsak 300 mg/kgBB per oral/hari).^{7,8}

Hewan coba diaklimatisasi dengan lingkungan

laboratorium selama 7 hari dan diberi diet (makan dan minum) standar *ad libitum*.

Pembuatan Model Tumor Payudara

Pembuatan model tumor payudara pada tikus putih menggunakan 7,12 dimetilbenz(α) antracene (DMBA) 100 mg dilarutkan dalam minyak biji bunga matahari 100 mL dan *ethinyl estradiol* (estrogen). DMBA dosis 1 mg/mL diinjeksikan sebanyak 1 mL subkutan pada mammae daerah abdomen sebelah kanan sebanyak 8 kali setiap dua hari untuk setiap tikus putih. *Ethinyl estradiol* diinjeksikan secara intramuskular di paha kaki kanan belakang sebanyak lima kali setiap empat hari sekali di antara injeksi DMBA dengan dosis 20.000 IU/kgBB.⁹

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sirsak

Daun sirsak yang telah dipetik disortasi, dicuci dengan air dan dikeringkan pada suhu ruangan tidak terkena cahaya matahari langsung selama 3 hari. Daun sirsak kering kemudian diblender halus ditimbang sebanyak 1000 gram dan dimaserasi dalam larutan etanol 96% sebanyak 5,5 L selama 4 hari. Hasil maserasi kemudian disaring menggunakan kertas saring *Whatman* No.1 hingga tidak tersisa residu atau padatan. Setelah itu, hasil filtrasi diuapkan pelarutnya menggunakan *rotatory evaporator* hingga didapatkan fraksi kental sebanyak 82 gram. Bahan kemudian disimpan dalam botol kaca pada suhu 4°C. Ekstrak etanol daun sirsak

dibagi menjadi 3 dosis, yaitu 75 mg/kgBB, 150 mg/kgBB, dan 300 mg/kgBB.

Tikus putih dieutanasia dengan cara anestesi inhalasi menggunakan kloroform. Setelah tikus dieutanasia, jaringan payudaranya diambil, kemudian dibuat sediaan mikroskopis pulasan hematoksilin eosin untuk dinilai gambaran histologinya.¹⁰

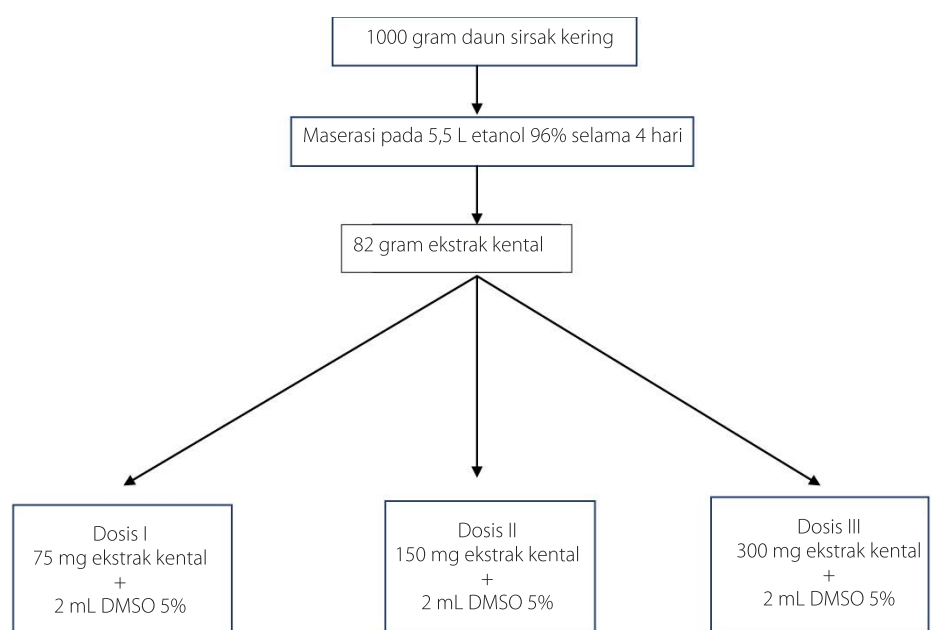
Uji Statistik

Data dianalisis dengan uji statistik *Fisher's exact test* menggunakan program *Statistical Product and Social Sciences (SPSS) 23 for Windows*.

HASIL

Kelompok perlakuan I dan II mati saat penelitian masih berjalan, sehingga hasil yang akan dipaparkan adalah dari kelompok normal, kontrol negatif, kontrol positif, dan perlakuan III.

Kelompok normal menunjukkan 4 tikus (100%) normal. Histologi payudara normal terdiri dari beberapa lobi yang dipisahkan oleh jaringan ikat interlobar padat, masing-masing lobus dibagi menjadi beberapa lobuli. Lobuli dipisahkan jaringan kolagen interlobular, masing-masing lobulus terdiri atas sistem duktus, yaitu duktus alveolar yang dibatasi epitel selapis kuboid. Kadang-kadang ditemukan saluran lebih besar, yaitu duktus laktiferus dengan epitel silindris selapis. Jaringan ikat intralobular yang mengelilingi



Gambar 1. Tahapan pembuatan ekstrak etanol daun sirsak



HASIL PENELITIAN

duktus di dalam setiap lobulus tampak lebih longgar.¹¹

Di kelompok kontrol negatif, 2 tikus (50%) menunjukkan hiperplasia dengan atipia dan 2 tikus (50%) karsinoma invasif. Hiperplasia dengan atipia adalah proliferasi sel epitel monomorfik intraduktal dengan histologi dan sitologi menyerupai karsinoma duktal *in situ* derajat rendah, sedangkan karsinoma invasif dikenali dari bentuk tidak beraturan dan telah menginfiltrasi ke dalam stroma.^{12,13} Hiperplasia dengan atipia memiliki ciri-ciri lebih dari dua lapis sel dan populasi sel heterogen dengan morfologi berbeda. Karsinoma invasif memiliki ciri-ciri penampikan mikroskopik sangat heterogen dan tepi tumor secara khas tidak teratur.¹⁴

Di kelompok kontrol positif, 2 tikus (50%) menunjukkan gambaran histologi kelenjar payudara normal dan 2 tikus (50%) hiperplasia dengan atipia. Gambaran histologi kelenjar payudara normal memiliki dua lapisan sel,¹⁵ yang terdiri dari satu lapisan sel lumina menutupi lapisan kedua berupa sel mioepitel.¹⁴

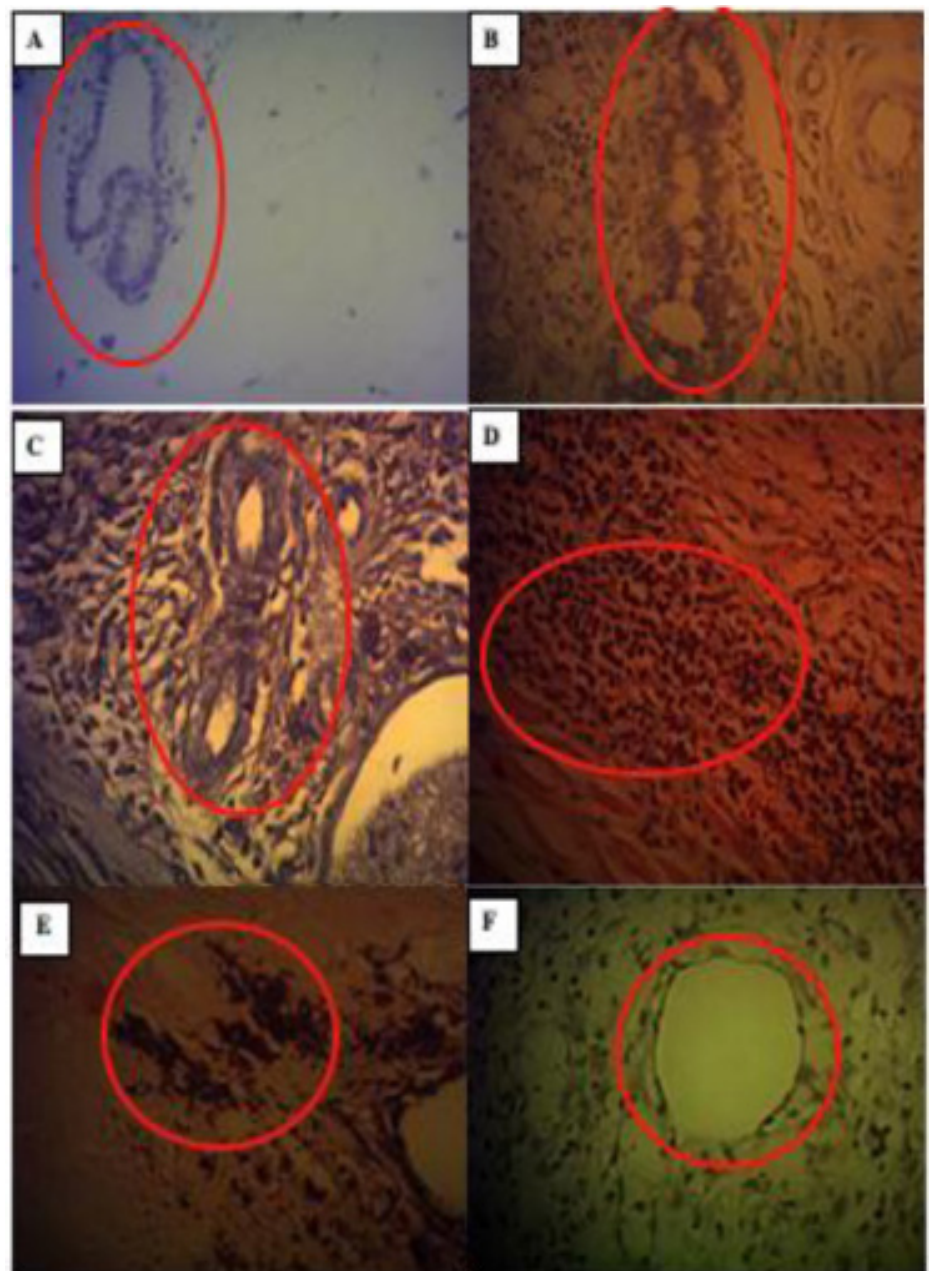
Di kelompok perlakuan III (300 mg/kgBB/hari), 4 tikus (100%) mengalami hiperplasia dengan atipia. Seluruh kelompok menunjukkan gambaran histologi lain berupa peradangan, nekrosis, dan kista. Peradangan adalah respons kompleks biologi jaringan pembuluh darah terhadap stimulus berbahaya seperti patogen, sel-sel tubuh yang rusak atau iritan.¹⁶ Sedangkan nekrosis adalah kematian sel yang disebabkan oleh kerusakan sel akut dan irreversibel, sehingga sel tidak dapat melangsungkan metabolisme.¹⁷ Kista diartikan sebagai pembentukan suatu rongga patologis di dalam substansi organ dan merupakan suatu kantong rapat, dilengkapi membran yang tegas dan berisi cairan atau semi cairan.¹⁸ Peradangan memiliki ciri-ciri histologis duktus berisi debris granuler, kadang-kadang terdiri dari makrofag dan leukosit, epitel yang melapisinya telah rusak, adanya infiltrat limfoplasmatik yang mencolok dan kadang-kadang ditemukan granuloma pada stroma periduktus.¹⁴ Nekrosis memiliki ciri-ciri sel nekrotik dikelilingi neutrofil dan makrofag, kadang-kadang dengan sel datia (*giant cells*). Lapisan epitel kista lebih besar dapat mendatar atau bahkan sangat atrofik. Stroma yang mengelilingi kista terdiri dari jaringan fibrosa padat yang telah kehilangan

penampilan miksomatosa yang lembut dari stroma payudara normal dan biasa ditemukan infiltrat pada stroma.¹⁴ Gambaran histologi sel tumor payudara dapat dilihat pada Tabel dan Gambar 2.

Berdasarkan hasil analisis (Gambar 2), terlihat tidak ada perbedaan gambaran histologi antar kelompok penelitian. Hasil uji *Fisher's exact test* ($p \geq 0,05$) menunjukkan tidak ada perbedaan antara kelompok penelitian.

Tabel. Gambaran histologi hewan coba

Kelompok	Gambaran Histologi		Karsinoma Invasif	Uji Statistik
	Normal	Hiperplasia dengan Atipia		
Kontrol Negatif	0	2 (50%)	2 (50%)	<i>Fisher's Exact Test</i>
Kontrol Positif	2 (50%)	2 (50%)	0	$p=0,079$
Dosis Ekstrak 300 mg/kgBB/hari	0	4 (100%)	0	



Gambar 2. Gambaran histologi sel tumor payudara pada perbesaran 40x dan pewarnaan HE.

(A) Epitel kuboid selapis. (B) Hiperplasia epitel dengan atipia. (C) Karsinoma invasif. (D) Peradangan. (E) Nekrosis. (F) Kista. (Lingkaran merah).



HASIL PENELITIAN



PEMBAHASAN

Hasil pengamatan kelompok kontrol negatif menunjukkan 2 tikus (50%) hiperplasia dengan atipia dan 2 tikus (50%) karsinoma invasif. Kelompok kontrol negatif adalah kelompok yang mendapat induksi tumor payudara kemudian dimetil sulfoksida (DMSO) 5% per oral, artinya 7,12 dimetilbenz(α) antracene (DMBA) dapat menimbulkan kanker. DMBA merupakan hidrokarbon polisiklik aromatik yang dioksidasi menjadi 7,12-DMBA-3,4 oksida oleh enzim sitokrom P450 (CYP), akan dihidrolisis menjadi bentuk diol dan dioksidasi kembali oleh sitokrom P450 menjadi 7,12-DMBA-3,4 oksidadio 1-1,2 epoksida yang bersifat karsinogen. Metabolit DMBA bersifat toksik dan menyebabkan stres oksidatif, sehingga menyebabkan kerusakan struktur sel dan nekrosis sel.¹⁹ DMBA berperan meningkatkan laktat dehidrogenase yang diikuti dengan nekrosis, selain itu DMBA berperan meningkatkan protein MDM2 yang dapat menghambat supresor tumor p53, meningkatkan ekspresi protein *cyclin D1* protein mendorong siklus sel melalui fase G1, serta meningkatkan protein p27, sehingga mengaktifkan kompleks *cyclin D/cdk* mendorong siklus pembelahan sel dan menghambat terjadinya apoptosis.²⁰

Risiko kanker akan meningkat jika terjadi ketidakseimbangan metabolisme estrogen.²¹ Beberapa efek estrogen di antaranya kerusakan DNA, mutasi DNA, transformasi neoplastik, dan meningkatkan perkembangan tumor.²² Ada tiga bentuk estrogen di tubuh manusia, yaitu estradiol, estron, dan 16-hydroxyestradiol (estriol).²³ Estradiol merupakan estrogen yang paling aktif secara biologi di tubuh manusia.²¹ Gangguan metabolisme estrogen akan meningkatkan produksi estrogen katekol, jika estrogen katekol berikatan dengan DNA akan menginisiasi terjadinya kanker.²¹

Hasil pengamatan histologi kelompok kontrol positif menunjukkan 2 tikus (50%) gambaran histologi kelenjar payudara normal dan 2 tikus (50%) hiperplasia dengan atipia. Kelompok kontrol positif adalah kelompok yang mendapat *tamoxifen* 50 mg/kgBB/hari per oral. *Tamoxifen* merupakan SERM (modulator

reseptor estrogen selektif) anti-estrogen yang berikatan secara kompetitif dengan ER (reseptor estrogen) mengakibatkan pemblokiran angiogenesis, menurunkan produksi IGF-1 dan TGF, menginduksi *TGF-calmodulin* dan protein kinase C, serta meningkatkan aktivitas *natural killer cell*.²⁴ Masih adanya hiperplasia dengan atipia pada kelompok ini mungkin karena tidak semua karsinogenesis akibat DMBA dapat dihambat oleh *tamoxifen*. *Tamoxifen* terbatas menghambat persinyalan estrogen. DMBA menimbulkan kanker melalui berbagai jalur yang tidak semuanya bisa dihambat oleh *tamoxifen* sebagaimana dijelaskan di atas.

Hasil pengamatan histologi kelompok perlakuan III (300 mg/kgBB/hari) menunjukkan 4 tikus (100%) hiperplasia dengan atipia. Hal ini berbeda dengan hasil penelitian Evy¹⁰ yang mengungkapkan dosis 300 mg/kgBB/hari ekstrak etanol daun sirsak menunjukkan penghambatan tumor payudara dengan gambaran sel normal, histologi normal, dan tidak ada pleomorfisme inti. Perbedaan ini mungkin karena sirsak yang berasal dari area budidaya berbeda memproduksi senyawa bioaktif dengan konsentrasi berbeda. Spesies yang sama pada lokasi berbeda akan menghasilkan metabolit sekunder dengan konsentrasi berbeda.²⁵ Meskipun kelompok perlakuan III (300 mg/kgBB/hari) tidak menunjukkan perbaikan, tikus kelompok III (300 mg/kgBB/hari) lebih dapat bertahan hidup dibandingkan kelompok perlakuan I (75 mg/kgBB/hari) dan kelompok perlakuan II (150 mg/kgBB/hari).

Penelitian melaporkan ekstrak daun sirsak memiliki aktivitas anti-kanker karena mengandung senyawa-senyawa seperti alkaloid, fenolik, megastiman, flavonol triglikosida, siklopeptida, asetogenin, dan minyak esensial.²⁶ Asetogenin merupakan senyawa yang banyak diteliti memiliki efek anti-kanker.²⁶ Asetogenin dapat menghambat ATP, sehingga menghambat mitosis. Asetogenin juga menghambat aktivasi *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) dengan menghalangi induksi hipoksia dari protein HIF-1 α dan menghambat angiogenesis tumor hipoksia

dengan menekan induksi hipoksia dari HIF-1 gen target VEGF (faktor pertumbuhan endotel vaskular) dan GLUT-1 (*glucose transporter-1*). Dihambatnya aktivitas HIF-1 menyebabkan penekanan mitokondria pada kompleks I. Selain itu, asetogenin juga menghambat DNA, mengaktifkan AMPK dan menghambat jalur persinyalan mTORC1, menghambat protein kinase B (Akt) dan protein *cyclin D1*, serta mengakibatkan apoptosis.²⁷

Kelompok kontrol positif, kontrol negatif, dan perlakuan III (300 mg/kgBB/hari) menunjukkan histologi berupa peradangan, nekrosis, dan kista. Hal ini didukung oleh penelitian Wang²⁸ yang mengungkapkan pada tikus yang diinduksi DMBA menunjukkan peningkatan sitokin proinflamasi (TNF- α , IL-1 β , dan IL-6), NF- κ B, serta perubahan histologi berupa nekrosis perisentral mitosis dan pleomorfisme. TNF- α adalah sitokin inflamasi yang bertanggungjawab pada inflamasi jaringan, IL-6 adalah sitokin pleiotropik berperan pada pertumbuhan dan diferensiasi sel, IL-1 β merupakan sitokin proinflamasi yang berperan penting dalam inflamasi, sedangkan NF- κ B adalah faktor transkripsi penting pada peradangan jaringan. Efek proliferasi DMBA dan estrogen dapat meningkatkan laju mutasi sel epitel, sehingga mempercepat kejadian perubahan preneoplastik seperti kista.²⁹

SIMPULAN DAN SARAN

Ekstrak etanol daun sirsak dosis 300 mg/kgBB/hari tidak memengaruhi perubahan histologi kelenjar payudara pada tikus putih galur *Sprague Dawley* yang diinduksi 7,12 dimetilbenz(α)antracene (DMBA) dan estrogen. Keterbatasan penelitian ini adalah kelompok perlakuan I dan II tidak dapat dianalisis karena kematian hewan coba saat penelitian, diduga karena induksi DMBA. Penelitian selanjutnya dapat menyesuaikan dosis DMBA agar tidak menyebabkan kematian hewan coba.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini didanai oleh dana DIPA Untan Tahun 2018.

DAFTAR PUSTAKA

1. Rahman SA, Al-Marzouki A, Otim M, Khalil Khayat NEH, Yousuf R, Rahman P. Awareness about breast cancer and breast self-examination among female students at the University of Sharjah: A cross-sectional study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019;20(6):1901-8.
2. Bilqistiputri F, Susantiningih T, Mustofa S, Windarti I. Efek kemopreventif pemberian infusa daun sirsak (*Annona muricata* L.) pada epitel duktus jaringan payudara tikus betina galur *Sprague Dawley* yang diinduksi senyawa 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA). *J Majority*. 2014;3(2):74-81.



HASIL PENELITIAN



3. Oncolex. Histology of breast cancer [Internet]. 2018. Available from: <http://oncolex.org/Breast-cancer/Background/Histology?lg=print>
4. World Cancer Research Fund International. Diet, nutrition, physical activity and breast cancer. Breast Cancer Report; 2017.
5. Ioannis P, Anastasis S, Yiallouris A. Graviola: A systematic review on its anticancer properties. Am J Cancer Prev. 2015;3(6):128–31.
6. Muhartono, Sutyarso, Kanedi M. Mucoxin (Acetogenin) inhibits proliferation of T47D breast cancer by suppressing expression of cyclin D1 mediated by p53. Int J Cancer Res. 2016;12(2):101–8.
7. Gaol FFL. Pengaruh pemberian ekstrak etanol biji jengkol (*Pithecellobium lobatum* Benth.) terhadap penurunan kadar glukosa darah dan peningkatan kadar ureum dan kreatinin tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague Dawley yang diinduksi aloksan. J Majority. 2014;3(3).
8. Sastroasmoro S, Sudigdo, Ismael S. Dasar-dasar metodologi penelitian klinis. Binarupa Aksara. Jakarta; 1995.
9. Naciff JM, M.Lynn J, Suzanne MT, Gregory JC, Jay PT, Gary JO, et al. Gene expression profile induced by 17 α -ethynyl estradiol, bisphenol A, and genistein in the developing female reproductive system of the rat. Toxicological Sci. 2002;68:184-99.
10. Sulistyoningrum E, Prasasti E, Rachmani N, Baroroh HN, Rujito L. *Annona muricata* leaves extract reduce proliferative indexes and improve histological changes in rat's breast cancer. 2017;7(01):149–55.
11. Wonodirekso S, Martoprawiro M, Siswojo SK, Guritnoko I, Soeharto HR, Tanzil R, et al. Penuntun praktikum histologi. 2nd Ed. Jakarta: Dian Rakyat; 2013 .p. 181.
12. Faggian A, Latronico A, Nicosia L, Faggian A, Abbate F, Penco S. Atypical ductal hyperplasia: Our experience in the management and long term clinical follow-up in 71 patients. Breast 2017;37(2018):1–5.
13. Alkabban FM, Ferguson T. Breast cancer. StatPearls [Internet]. 2020 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482286/>
14. Kumar V, Cotran R, Robbins S. Buku ajar patologi. 9th ed. Jakarta: EGC; 2015 .p. 694-703.
15. Lategan B. Breast nonmalignant. General normal histology of breast. Pathology Outlines. The Ohio State University; 2015.
16. Tjitaresmi AIDS. Aktivitas antinflamasi dari berbagai tanaman: Sebuah review. Farmaka. 2016;14(3):77–86.
17. Susilowati S, Triana IN. Protein kasar plasma seminalis sapi menurunkan kejadian nekrosis spermatozoa kambing yang disimpan pada suhu dingin. Veteriner 2016;17(1):57–63.
18. Azhar S, Goereti M, PS. E nukleasi kista dentigerous pada coronoid mandibula sinistra di bawah anestesi umum. MKGK. 2015;1(2):99-103.
19. Adelina R, Febriyanti R, Oktoberia IS, Intan PR. Ekstrak daun *Annona muricata* Linn. sebagai antiproliferasi terhadap sel hepar tikus terinduksi 7,12 dimetilbenz[a]anthracene (DMBA). J Kefarmasian Indon. 2014;4(1):1–12.
20. Frenkel K, Wei L, Wei H. 7,12-dimethylbenz(a) anthracene induces oxidative DNA modification in vivo. Free Radic Biol Med. 1995;19(3):373–80.
21. Cavalieri EL, Rogan EG. Depurinating estrogen-DNA adducts, generators of cancer initiation: Their minimization leads to cancer prevention. Clin Transl Med. 2016;5(12):1–15.
22. Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. N Engl J Med. 2006;354(3):270–82.
23. Samavat H, Kurzer MS. Estrogen metabolism and breast cancer. Cancer Lett. 2015;356(2):231–43.
24. Karn A, Jha AK, Shrestha S, Acharya B, Poudel S, Bhandari RB. Tamoxifen for breast cancer. J Nepal Med Assoc. 2010;49(177):62–7.
25. Syed Najmuddin SU, Romli MF, Hamid M, Alitheen NB, Nik Abd Rahman NM. Anti-cancer effect of *Annona muricata* Linn Leaves Crude Extract (AMCE) on breast cancer cell line. BMC Complement Altern Med. 2016;16(1):311.
26. 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;16:15625–58.
27. Kurniasih N, Kusmiyati M, Sari RP, Wafdan R. Potensi daun sirsak (*Annona muricata* linn), daun binahong (*Anredera cordifolia* (ten) steenis), dan daun benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) sebagai antioksidan pencegah kanker. J ISTEK. 2015;9(1):162-83.
28. Wang Z, Zhang X. Chemopreventive activity of honokiol against 7,12 - dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary cancer. Front Pharmacol. 2017;8(320):1–11.
29. Ting AY, Kimer BF, Fabian CJ, Petroff BK. Characterization of a preclinical model of simultaneous breast and ovarian cancer progression. Carcinogenesis 2007;28(1):130–5.