

Aktivitas Sitotoksik dan Induksi Apoptosis dari Ekstrak Etanol Kulit Apel Hijau (*Pyrus malus L.*) terhadap Sel MCF-7

Syahrul Iqbal Setiawan¹, Erika Indah Safitri¹, Laili Nailul Muna², Devi Nisa Hidayati^{1*}

¹Fakultas Farmasi, Universitas Wahid Hasyim, Semarang, Jawa Tengah, Indonesia

²Prodi Pendidikan Kimia, Fakultas Ilmu Tarbiyah dan Keguruan, Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga, Sleman, Yogyakarta, Indonesia

Email: devinisahidayati@yahoo.com

ABSTRAK

Ekstrak kulit apel hijau (*Pyrus malus L.*) mengandung senyawa Quercetin yang mampu menurunkan ekspresi Bcl-2. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik dan induksi apoptosis ekstrak etanol kulit apel hijau (EEKAH) pada model sel kanker payudara MCF-7. Serbuk kulit apel hijau diekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% dengan metode ultrasonik. Uji sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan metode MTT Assay pada konsentrasi EEKAH yaitu 31,25; 62,5; 125; 250; 500 dan 1000 µg/mL. Hasil uji sitotoksik dihitung nilai IC₅₀ menggunakan regresi linier. Pengamatan induksi apoptosis dengan konsentrasi ½ IC₅₀ (442,5 µg/ml) dan IC₅₀ (885 µg/ml) menggunakan *flowcytometry*. Analisis data dianalisis menggunakan analisis statistik *One Way Anova*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa EEKAH memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai IC₅₀ sebesar 885 µg/ml. Persentase rata-rata fase apoptosis total EEKAH pada konsentrasi ½ IC₅₀ sebesar 30,2% ($p > 0,05$) dan IC₅₀ sebesar 47,9% ($p < 0,05$) dibandingkan kontrol sel sebesar 12,7%. EEKAH mampu menginduksi apoptosis terhadap sel MCF-7.

Kata kunci: MCF-7, *Pyrus malus L.*, Sitotoksisitas, Apoptosis

ABSTRACT

Green apple peel extract (Pyrus malus L.) contains Quercetin compound which decrease Bcl-2 expression. The aims of this study was to determined the cytotoxic activity and apoptosis induction of green apple peel ethanol extract (GASEE) on MCF-7 breast cancer cells. The green apple peel powder was extracted using 70% ethanol solvent by ultrasonic method. Cytotoxic test against MCF-7 breast cancer cells using the MTT Assay method at the GASEE concentration, namely 31.25; 62.5; 125; 250; 500 and 1000 µg/mL. The results of the cytotoxic test calculated the IC₅₀ value using linear regression.

Determination of apoptosis induction with a concentration of $\frac{1}{2}$ IC₅₀ (442.5 μ g/mL) and IC₅₀ (885 μ g/mL) using flowcytometry. Data analysis was analyzed using statistical analysis One Way Anova. The results showed that GASEE has cytotoxic activity with an IC₅₀ value of 885 μ g/ml. Average percentage of total apoptosis phase are $\frac{1}{2}$ IC₅₀ concentration of 30.2% ($p>0.05$) and IC₅₀ of 47.9% ($p<0.05$) than cell control of 12.6%. GASEE can apoptosis induced against MCF-7 cells.

Keywords: MCF-7, Pyrus malus L., Cytotoxicity, Apoptosis

I. PENDAHULUAN

Saat ini kejadian kanker payudara pada wanita tercatat tinggi dengan jumlah kematian sebesar 600 ribu kasus dari jumlah penderita 2 juta di dunia. Data kasus kanker payudara di Indonesia tercatat kematian sebesar 22 ribu dari 58 ribu kasus (GLOBOCAN, 2018). Terapi pengobatan antikanker sekarang masih mengakibatkan efek yang tidak diinginkan (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2018). Efek tersebut dapat diakibatkan karena obat-obat kemoterapi tidak hanya membunuh sel kanker, namun juga sel normal. Sehingga, perlunya pengembangan terapi menggunakan obat alam sebagai bahan alternatif pengobatan (Sugiarto, 2006).

Masyarakat lebih memilih menggunakan pengobatan herbal yang memiliki efek samping minimal (Bethesda, 2007). Tanaman apel telah dibuktikan memiliki aktivitas antikanker. Tanaman tersebut dapat tumbuh di daerah tropis seperti Indonesia. Buah apel merupakan buah yang sering dikonsumsi oleh masyarakat, namun bagian kulitnya

merupakan bahan buangan yang selama ini hanya digunakan sebagai pakan ternak atau pupuk (Subagyo & Achmad, 2010).

Senyawa flavonoid memiliki aktivitas sitotoksik serta mempengaruhi pertumbuhan sel kanker dengan cara apoptosis atau mencegah angiogenesis (Kozłowska & Szostak-Wegierek, 2014). Rastini *et al.* (2019) menyatakan bahwa quercetin menunjukkan aktivitas sebagai agen antikanker payudara. Ekstrak etanol kulit apel manalagi terbukti memiliki metabolit sekunder yaitu alkaloid, steroid, triterpenoid, flavonoid, fenol, dan tannin (Novioella, 2019). Penelitian sebelumnya menyebutkan quercetin murni mampu meningkatkan caspase-3 pada sel MDAMB 231 sehingga menginduksi apoptosis (Chien *et al.*, 2009).

Senyawa flavonoid dapat ditarik menggunakan pelarut etanol 70% karena senyawa flavonoid bersifat polar dan pelarut etanol 70% juga bersifat polar sehingga dapat dengan mudah untuk menarik senyawa flavonoid (Pertiwi *et al.*, 2016). Quercetin memiliki kemampuan memacu proses apoptosis pada sel kanker

payudara MCF-7 (Duo *et al.*, 2012). Mekanisme lain dari kuersetin juga dilaporkan mampu menstimulasi pelepasan sitokrom C sehingga meningkatkan apoptosis (Taraphdar *et al.*, 2001). Pelepasan sitokrom C oleh mitokondria dikarenakan terhambatnya ekspresi Bcl-2 yang kemudian menginduksi jalur caspase (Youle & Strasser, 2018).

Berdasarkan telaah literatur yang telah dilakukan, belum pernah dilaporkan penelitian terkait ekstrak etanol kulit buah apel hijau sebagai agen antikanker terhadap sel MCF-7. Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk mengembangkan potensi ekstrak etanol kulit apel hijau dalam aktivitas sitotoksik dan induksi apoptosis terhadap sel kanker payudara MCF-7.

II. METODE

A. Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan meliputi kulit apel hijau yang diperoleh dari buah apel hijau (*Pyrus malus* L.); Sel MCF-7 adalah biakan sel dari Laboratorium Kultur Sel Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, media RPMI (Gibco), penisilin-streptomisin 1% v/v (Gibco), fungizone 0,5% v/v (Gibco), FBS 10% v/v (Sigma), DMSO 100% (Merck), Reagen MTT, pereaksi stopper (SDS 10% (Merck) dalam 0,01N HCl), tripsin-EDTA 0,25%

(Sigma), PBS (Biogear). Alat-alat yang digunakan yaitu ultrasonik (BRANS), lemari pengering, mesin penyerbuk, alat-alat gelas (Iwaki dan Pyrex), penguap vacum putar (Heidolph), timbangan analitik (Excellent), *moisture balance* (Ohaus), pengaduk, corong buchner, inkubator CO₂ (Thermosience), *biosafety cabinet* (ESCO), *tissue cultur dish*, mikroskop *inverted* (Maqns), *conical tube* (Falcon), mikropipet (Socorex), *blue-tip*, *yellow-tip*, *haemocytometer* (Assistant), *hand counter*, *96-well plate* (Corning), mikrotube (Eppendorf), vortex (Clever scientific), *ELISA reader* (Tecan Infinite F50), FITC Annexin V (BD Pharmingen), *Flowcytometer* (BD FACSCanto III).

B. Pembuatan Serbuk Kulit Apel Hijau

Kulit apel hijau didapatkan dari buah apel hijau dengan usia 5 bulan yang dipanen Kota Batu, Kabupaten Malang, Jawa Timur. Kulit apel yang digunakan berasal dari buah apel hijau yang masih segar dan tidak berpenyakit. Apel hijau sebanyak 5,160 kg disortasi basah dan dicuci dengan air mengalir. Kulit apel diambil dengan menggunakan pisau diperoleh sebanyak 770 gram selanjutnya dikeringkan dengan lemari pengering pada suhu 40°C sampai kering. Simplisia kulit apel hijau kemudian diserbuk sehingga diperoleh serbuk kulit apel hijau sebanyak 185 gram.

C. Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Apel Hijau

Proses ekstraksi kulit apel hijau dengan metode ultrasonik menggunakan pelarut etanol 70%. Serbuk simplisia kulit apel hijau sebanyak 185 gram dimasukkan dalam *beaker glass* kemudian ditambahkan etanol 70% dengan perbandingan 1 : 10. Jumlah pelarut yang digunakan adalah 1850 mL. Ekstraksi dilakukan pada suhu 40°C yang dilakukan selama 30 menit menggunakan frekuensi 40 kHz. Filtrat yang dihasilkan dilakukan proses penguapan menggunakan penguap vacuum putar suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental.

D. Preparasi Sel MCF-7

Sel MCF-7 dalam ampul yang berada pada tangki nitrogen cair diambil, kemudian dicairkan pada suhu kamar. *Conical tube* yang berisi media kultur ditambahkan dengan sel yang telah cair tadi sebanyak 1000 µL, dilanjutkan dengan proses sentrifugasi selama 5 menit. Supernatan dibuang kemudian endapan di resuspensi ulang dengan media kultur sebanyak 4 mL. Suspensi sel dipindahkan dan ditumbuhkan dalam 2 buah *tissue culture dish* kemudian ditambahkan 5 mL media kultur, diinkubasi dalam inkubator CO₂ (CCRC, 2009).

E. Pembuatan sampel uji ekstrak etanol kulit apel hijau

Sepuluh mg ekstrak etanol kulit apel hijau dalam mikrotube, dilarutkan dalam 100 µL DMSO dan dihomogenkan dengan *vortex*. Sehingga konsentrasi stok sebesar 100.000 µg/mL. Sampel uji kemudian diencerkan hingga mendapatkan konsentrasi 1000; 500; 250; 125; 62,5 dan 31,25 µg/mL untuk pengujian sitotoksitas dan seri konsentrasi IC₅₀ (885 µg/mL) dan ½ IC₅₀ (442,5 µg/mL) untuk pengujian apoptosis sel kanker payudara MCF-7.

F. Pemanenan Sel

Sel yang sudah konfluen sekitar 80% dipanen dengan cara media kultur di buang dan sel yang sudah sekitar 80% konfluen kemudian media kultur di buang dengan menggunakan pipet pasteur steril, sel dicuci dengan menggunakan PBS sebanyak 1 kali. Larutan PBS dibuang sehingga sel yang mati akan ikut terbuang. Selanjutnya ditambah dengan tripsin EDTA 0,25% sebanyak 300 µL dan diinkubasi selama 3 menit. Tambahkan 3 mL media kultur untuk menginaktifkan tripsin kemudian resuspensi sel dengan mikropipet agar tidak ada sel yang menggerombol dan amati dibawah mikroskop *inverted* untuk memastikan tidak ada sel yang menggerombol.

Pindahkan suspensi sel ke dalam *conical tube* steril (CCRC, 2009).

G. Uji Sitotoksitas

Sel dipanen dan dihitung kemudian diisi 100 μL sel dengan jumlah sel 1×10^4 sel/sumuran kedalam *96-well plate*, 3 sumuran tidak diisi digunakan untuk kontrol media. Sel diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO_2 . *Plate* yang berisi sel diambil dari inkubator CO_2 kemudian media sel dibuang dengan cara membalik *plate* diatas tempat buangan. Dicuci dengan PBS sebanyak 100 μL dan dibuang kembali. Dibuat seri konsentrasi ekstrak etanol kulit apel hijau 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diambil sebanyak 10 μL dari larutan stok 100.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 500; 250; 125; 62,5 dan 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ masing-masing sebanyak 500 μL kemudian ditambahkan media kultur sebanyak 500 μL . Sebanyak 100 μL tiap konsentrasi dimasukkan kedalam sumuran. Pengisian dilakukan dari bawah keatas mulai dari konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO_2 . Setelah inkubasi amati kondisi sel dibawah mikroskop, media sel dibuang dan dicuci dengan PBS kemudian ditambahkan reagen MTT 5 mg/ml sebanyak 100 μL ke setiap sumuran dan inkubasi kembali 4 jam dalam inkubator CO_2 . Setelah inkubasi amati kondisi sel dibawah mikroskop, jika formazan telah terlihat

jelas maka tambahkan reagen *stopper* 100 μL SDS dalam HCl 0,01 N dan *plate* dibungkus menggunakan kertas atau aluminium foil dan diinkubasi pada suhu kamar di tempat gelap selama semalam, serapan dibaca dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 600 nm (CCRC, 2009).

H. Uji Apoptosis

Sel MCF-7 dengan kepadatan 5×10^5 sel/sumuran ditanam dalam 6 *well plate* masing-masing sebanyak 1000 μL namun 3 sumuran tidak diisi karena digunakan untuk kontrol sel dan dimasukkan dalam inkubator CO_2 selama 24 jam. Setelah sel normal mengalami 80% konfluen, media dibuang kemudian tiap sumuran dicuci dengan PBS. Sel diberi perlakuan ekstrak kulit apel hijau dengan seri konsentrasi IC_{50} (885 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dan $\frac{1}{2} \text{IC}_{50}$ (442,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Pada ekstrak etanol kulit apel hijau dimasukkan ke dalam sumuran masing-masing sebanyak 1000 μL ke dalam sumuran. Sebagai kontrol sel ditambahkan 1000 μL medium kultur ke dalam sumuran. *Plate* diinkubasi kembali selama 24 jam. Kondisi sel didokumentasikan untuk setiap perlakuan menjelang akhir inkubasi (Vasicek, 2019).

Media sel ditransfer ke *conical tube*, kemudian masing-masing sumuran dicuci dengan PBS. PBS diransfer ke dalam *conical tube* yang sama. Kemudian dilakukan pemanenan dengan

menambahkan tripsin-EDTA 0,25% ke dalam sumuran dan diinkubasi selama 3 menit. Media kultur ditambahkan ke dalam sumuran sebanyak 1000 µl/sumuran kemudian diresuspensi. Suspensi sel kemudian ditransfer ke dalam *conical tube* dan disentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit. Superatan dibuang sedangkan pellet (endapan) yang terbentuk ditempatkan dalam *conical tube* yang ditutup dengan aluminium foil. Pellet dilarutkan dengan 100 µl buffer kit annexin V-FLOUS ditambah 2 µl PI dan 2 µl annexin V. Suspensi sel kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 10 menit dalam suhu ruangan. Sel selanjutnya

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

Nilai persentase kehidupan sel digunakan untuk menghitung nilai IC₅₀ yang merupakan potensi sitotoksitas. Perhitungan nilai IC₅₀ didapat dari perbandingan konsentrasi ekstrak etanol kulit apel hijau vs persentase kehidupan sel menggunakan regresi linier (CCRC, 2009).

Analisis uji apoptosis

Data flowcytometry yang akan dianalisis untuk mendapatkan persentase sel pada 4 kuadran yaitu LL (*lower left*/persen sel hidup), LR (*lower right*/persen sel yang mengalami early apoptosis), UL

ditransfer ke dalam tabung *flowcytometry* dan dilakukan analisis dengan program *flowing* (FACS Calibur) untuk mengetahui profil induksi apoptosis (Vasicek *et al.*, 2019).

I. Analisis Data

Analisis uji sitotoksitas

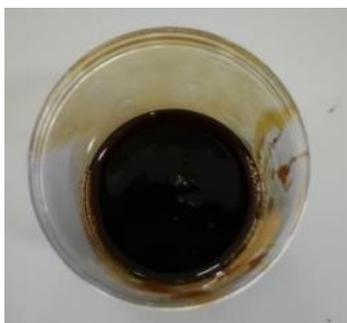
Analisis data uji sitotoksitas dilakukan untuk menghitung persentase kehidupan sel dan nilai IC₅₀. Data absorbansi dari pembacaan ELISA reader tiap sumuran digunakan untuk menghitung persentase kehidupan sel dengan rumus sebagai berikut.

(*upper left*/ persen sel yang mengalami nekrosis) dan UR (*upper right*/ late apoptosis) Analisis yang digunakan adalah program *flowing*. Hasil percobaan dibandingkan dengan kontrol sel menggunakan uji statistik IBM SPSS statistik 20 dengan menggunakan uji normalitas diperoleh data terdistribusi normal karena memiliki nilai sig >0,05, dilanjut uji homogenitas diperoleh varian data yang homogen dengan nilai sig>0,05. Analisis data tersebut menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen. Untuk mengetahui perbedaan bermakna pada semua kelompok perlakuan EEKAH maka

uji analisis statistik selanjutnya *one way annova* selanjutnya untuk mengetahui perbedaan pada masing-masing kelompok perlakuan maka dilakukan uji *Post Hoc* (Susianti, 2016).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil ekstrak kental kulit apel hijau (Gambar 1) diperoleh sebanyak 63,75 gram dengan rendemen 34,45%. Karakteristik ekstrak yang didapatkan kental, warna kecoklatan dan berbau khas.



Gambar 1. Ekstrak Etanol Kulit Apel Hijau (EEKAH)

Suatu pengujian untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari senyawa dapat dilakukan dengan pengujian sitotoksik. Pengujian tersebut untuk menguji toksisitas menggunakan kultur sel. IC_{50} merupakan konsentrasi sampel yang menunjukkan hambatan proliferasi sel sebanyak 50%, sehingga nilai IC_{50} inilah yang biasanya digunakan sebagai parameter uji sitotoksik (Haryoto dkk., 2013). Pengujian sitotoksik yang umum dilakukan adalah menggunakan metode MTT assay. Metode ini mengukur adanya kristal formazan yang terbentuk.

Kristal formazan ini akan terbentuk karena adanya reaksi antara garam MTT dengan enzim suksinat reduktase yang dimiliki oleh sel hidup yang terdapat pada organel mitokondria sel, sehingga semakin ungu warna yang dihasilkan maka menandakan semakin banyak sel yang hidup (Haryoto *et al.*, 2013).

Tabel I. Hasil uji sitotoksitas EEKAH pada sel MCF-7

Konsentrasi EEKAH ($\mu\text{g/mL}$)	% viabilitas sel
1000	44,05
500	72,87
250	93,78
125	98,89
62,5	107,76
31,25	111,89

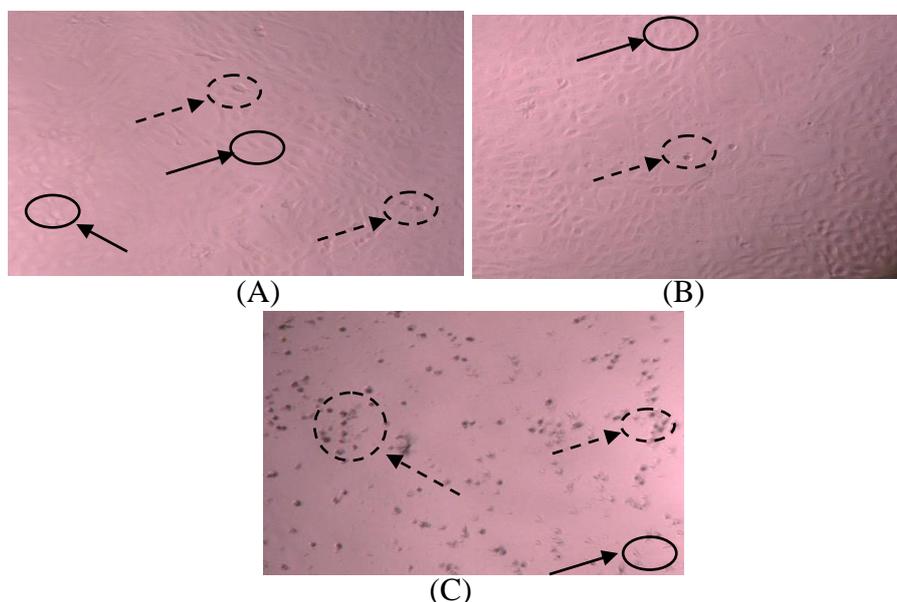
Uji aktivitas sitotoksik memperlihatkan % viabilitas sel yang makin kecil seiring dengan penambahan seri konsentrasi EEKAH (Tabel I). Penambahan EEKAH diketahui dapat mempengaruhi persentase viabilitas sel atau kehidupan sel secara spesifik. Morfologi sel MCF-7 (Gambar 2) memperlihatkan perbedaan bentuk sel MCF-7 yang hidup dan mati.

Nilai IC_{50} ekstrak etanol kulit apel hijau diperoleh dari sebesar 885 $\mu\text{g/mL}$. Hasil nilai IC_{50} yang diperoleh dapat dikategorikan sebagai moderat sitotoksik (Prayong *et al.*, 2008).

Pengujian apoptosis sel MCF-7 yang diberi perlakuan EEKAH dengan konsentrasi IC_{50} (885 $\mu\text{g/mL}$) dan $\frac{1}{2} IC_{50}$

(442,5 $\mu\text{g/mL}$). Analisis induksi apoptosis menggunakan *flowcytometry* dilakukan untuk mengetahui terjadinya kematian sel baik apoptosis maupun nekrosis (Zhang *et al.*, 2015). Persentase rata-rata distribusi

sel kanker payudara MCF-7 setelah perlakuan tunggal dengan ekstrak etanol kulit apel hijau (EEKAH) dapat dilihat pada Tabel II.



Gambar 2. Morfologi sel MCF-7 pengujian sitotoksitas setelah diberi seri konsentrasi EEKAH. Kontrol sel MCF-7 (A); EEKAH konsentrasi 62,5 $\mu\text{g/mL}$ (B); EEKAH konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ (C). Sel hidup (\rightarrow) dan sel mati ($\cdots\rightarrow$).

Sel MCF-7 dengan perlakuan EEKAH konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC_{50} (442,5 $\mu\text{g/mL}$) memberikan persentase apoptosis total sebesar 30,2%, sel dengan perlakuan IC_{50} (885 $\mu\text{g/mL}$) memberikan persentase apoptosis total sebesar 47,9%. Sedangkan pada kontrol sel persentase apoptosis total

sebesar 12,7%. Hasil tersebut memperlihatkan bahwa sel MCF-7 yang diberi perlakuan EEKAH konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC_{50} dan IC_{50} mampu meningkatkan persentase apoptosis total, dibandingkan dengan kontrol sel.

Tabel II. Persentase rata-rata distribusi sel kanker payudara MCF-7 setelah perlakuan tunggal dengan ekstrak etanol kulit apel hijau (EEKAH)

Perlakuan	Kontrol Sel	$\frac{1}{2}$ IC_{50}	IC_{50}
% sel hidup	85,9	65,4	47,5
% apoptosis awal	7,4	18,8	28,1
% apoptosis akhir	5,3	11,4	19,8
% apoptosis total	12,7a	30,2a	47,9a,b
% nekrosis	1,5	4,4	4,6

Keterangan: (a) $p < 0,05$ terhadap seluruh kelompok perlakuan, (b) $p < 0,05$ terhadap kelompok kontrol sel, $n=3$

IV. KESIMPULAN

Ekstrak etanol kulit apel hijau (EEKAH) mempunyai aktivitas sitotoksitas terhadap sel MCF-7 (sel kanker payudara) dengan nilai IC₅₀ sebesar 885 µg/mL. Ekstrak etanol kulit apel hijau (EEKAH) mampu menginduksi apoptosis sel MCF-7 pada konsentrasi 885 µg/mL (IC₅₀) sebesar 47,9% dibandingkan dengan kontrol sel yaitu sebesar 12,7%.

DAFTAR PUSTAKA

- Bethesda. (2007). *Fact Sheet Cervical Cancer*. National Institutes of Health.
- CCRC. (2009). *Standart Operating Procedure*. Cancer Chemoprevention Research Center.
- Chien, S. Y., Wu, Y. C., Chung, J. G., Yang, J. S., Lu, H. F., Tsou, M. F., Wood, W. G., Kuo, S. J., & Chen, D. R. (2009). Quercetin-induced Apoptosis Acts Through Mitochondrial- and Caspase 3-dependent Pathways in Human Breast Cancer MDA-MB-23 Cells. *HET*, 28, 493–503.
- Duo, J., Ying, G. G., Wang, G. W., & Zhang, L. (2012). Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. *Molecular Medicine Reports*, 5, 1453–1456.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2012.845>
- GLOBOCAN. (2018). *International Agency or Research on Cancer*. <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/360-indonesia-factsheets.pdf>. (Diakses tanggal 14 Januari 2020).
- Haryoto, Muhtadi, Indrayudha, P., Azizah, T., & Suhendi, A. (2013). Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Tumbuhan Sala (*Cynometra ramiflora* Linn.) Terhadap Sel Hela T47D dan WiDr. *Jurnal Penelitian Saintek*.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2018). *Panduan Penatalaksanaan Kanker Payudara*. Komite Penanggulangan Kanker Nasional.
- Kozłowska, A., & Szostak-Wegierek, D. (2014). Flavonoids-Food Source and Health Benefits. *Rocz Panstw Zakl Hi*, 65, 79–85.
- Novioella, A. M. (2019). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Kulit Apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill.). *Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim*, 44–52.
- Pertiwi, R. D., Cut, E. Y., & Nanda, F. P. (2016). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Limbah Kulit Buah Apel (*Malus domestica* Borkh.) Terhadap radikal bebas DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil). *Jurnal Penelitian*, 2, 81–92.
- Prayong, P., Barusrux, S., & Weerapreeyakul, N. (2008). Cytotoxic Activity Screening of Some Indigenous Thai Plants. *Fitoterapia*, 79, 598–601.
- Rastini, M. B. O., Giantari, N. K. M., Adnyani, K. D., & Laksmiani, N. P. L. (2019). Molecular Docking Aktivitas Antikanker Dari Quercetin Terhadap Kanker Payudara Secara In Silico. *Journal of Chemistry*, 13, 180–184.
- Subagyo, P., & Achmad, Z. (2010). Pemungutan Pektin dari Kulit dan Ampas Apel Secara Ekstraksi. *Eksergi*, 10.
- Sugiarto. (2006). Pendekatan Baru Terapi Kanker. *Medikora*, 2, 39–56.
- Susianti. (2016). Efek Timoquinon terhadap Apoptosis pada Sel Kanker Serviks. *JK Unila*, 1, 267–271.

- Taraphdar, Amit, K., Madhumita, Roy, & Bhattacharya, R. K. (2001). Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. *Current Science*, *80*, 1391.
- Vasicek, J., Balazi, A., & Chrenek, P. (2019). Staurosporine-Induced Apoptosis: Analysis By Different Annexin V Assays. *Slovak J. Anim. Sci*, *52*, 47–52.
- Youle, R. J., & Strasser, A. (2018). The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death, Nature Reviews. *Nature Reviews*, *9*, 47–59.
- Zhang, X., Zhang, S., Yin, Q., & Zhang, J. (2015). Quercetin induces human colon cancer cells apoptosis by inhibiting the nuclear factor-kappa B Pathway. *Pharmacognozy M*, *11*, 404–409.