

**EFEK EKSTRAK DAUN KELOR (*Moringa oleifera*) terhadap PERUBAHAN
EKSPRESI CYSTEINE ASPARTIC PROTEASE-9 (CASPASE-9) AKTIF pada
APOPTOSIS CELL-LINE KANKER PAYUDARA MCF-7**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi**



Oleh:

Abni Rachmi Nopitasari

NIM : 105070500111037

PROGRAM STUDI FARMASI

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2014

ABSTRAK

Nopitasari, Abni Rachmi. 2014. Efek Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Perubahan Ekspresi *Cysteine Aspartic Protease-9* (Caspase-9) Aktif pada Apoptosis *Cell-Line* Kanker Payudara MCF-7. Tugas Akhir, Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) dr. Hidayat Sujuti, Ph.D., Sp.M. (2) Valentina Yurina, S.Si., M.Si

Kanker payudara merupakan kanker yang memiliki prevalensi tertinggi pada perempuan. Daun kelor (*M. oleifera*) mengandung quercetin, kaempferol dan benzil isotiosianat yang dapat meningkatkan aktivitas dari caspase-9 dan juga menginduksi apoptosis. Penelitian ini bertujuan membuktikan bahwa ekstrak daun kelor dapat meningkatkan ekspresi caspase-9 dan meningkatkan apoptosis pada sel MCF-7. Penelitian ini merupakan percobaan studi eksperimental *in vitro*, *post-test only, control group design* pada sel kanker payudara MCF-7 secara *in vitro*. Daun kelor diekstrak dengan metode maserasi dengan pelarut etanol dan diuji secara kualitatif kandungannya. Dilakukan percobaan dosis hingga 20000 µg/ml menggunakan *MTT Assay* untuk menentukan IC_{50} . Selanjutnya $1/2x IC_{50}$, IC_{50} , $2x IC_{50}$ akan digunakan untuk uji ekspresi caspase-9 menggunakan metode imunositokimia dan uji apoptosis dengan *TUNEL Assay*. Data yang didapatkan dianalisis menggunakan ANOVA. Hasil penelitian ini ditemukan bahwa ekstrak daun kelor mengandung tanin, alkaloid, fenol, saponin, flavonoid dan tidak mengandung terpenoid. IC_{50} ditemukan pada dosis 2200 µg/ml. Ekstrak daun kelor pada kelompok perlakuan berpengaruh secara signifikan meningkatkan ekspresi caspase-9 ($p=0,000$) dan meningkatkan apoptosis ($p=0,000$) pada sel MCF-7. Terdapat hubungan yang kuat dan positif antara konsentrasi ekstrak pada ekspresi caspase-9 dan apoptosis MCF-7. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun kelor maka peningkatan ekspresi caspase-9 dan apoptosis akan semakin tinggi yang ditandai dengan masing-masing korelasi 0,895 dan 0,952. Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dapat meningkatkan ekspresi caspase-9 dan cenderung meningkatkan apoptosis *Cell-Line* Kanker Payudara MCF-7 dengan IC_{50} 2200 µg/ml.

Kata Kunci: *Moringa oleifera*, MCF-7, IC_{50} , Caspase-9, Apoptosis

ABSTRACT

Nopitasari, Abni Rachmi. 2014. The Effect Of Extract Moringa Leaves (*Moringa Oleifera*) to Changes Expression of Cysteine Aspartic Protease -9 (Caspase-9) Active In Apoptosis Breast Cancer Cell-Line MCF-7. Final Assigment, Pharmacy Program, Faculty of Medicine University of Brawijaya Malang. Supervisors: (1) dr. Hidayat Sujuti, Ph.D., Sp.M. (2) Valentina Yurina, S.Si., M.Si

Breast cancer is a cancer that has the highest prevalence in women. Moringa leaves (*M. oleifera*) contains quercetin, kaempferol and benzyl isothiocyanate which can enhance the activity of caspase-9 and also induces apoptosis. This research aimed to prove that the leaf extract of Moringa can increase the expression of caspase-9 and increase apoptosis in MCF-7 cells. This research used *experimental in vitro, post-test only, control group design* on breast cancer cells MCF-7 in vitro. Moringa leaves were extracted by maceration method with ethanol solvent and qualitative tested for its active compound. Dose experiments performed up to 20000 µg/ml used *MTT Assay* to determine IC_{50} . Furthermore, $1/2 \times IC_{50}$, IC_{50} , $2 \times IC_{50}$ was used to test the expression of caspase-9 using immunocytochemistry method and apoptosis test by *TUNEL assay*. The data was analyzed using ANOVA. The results of this study found that extract Moringa leaves contained tannin, alkaloid, phenol, saponin, flavonoid and didn't contain terpenoids. IC_{50} was found at a dose of 2200 µg/ml. Moringa leaves extract in the treatment group significantly increased the expression of caspase-9 ($p = 0.000$) and increased apoptosis ($p = 0.000$) in MCF-7 cells. There is a strong and positive relationship between the concentration of the extract on the expression of caspase-9 and apoptosis of MCF-7. Higher concentration of the Moringa leaves extract increased expression of caspase-9 with correlation coefficient 0.895 and also increased apoptosis with correlation coefficient 0.952. The conclusion of this study is extract of Moringa leaves (*Moringa oleifera*) was able to increase the expression of caspase-9 and tend to increase apoptosis in breast cancer cell-line MCF-7 with IC_{50} 2200 µg/ml.

Key word: *Moringa oleifera*, MCF-7, IC_{50} , Caspase-9, Apoptosis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvii
 BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Akademik.....	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	5

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Payudara	6
2.1.1 Definisi Kanker Payudara	6
2.1.2 Epidemiologi Kanker Payudara.....	7
2.1.3 Etiologi Kanker Payudara	9
2.1.4 Tanda dan Gejala Kanker Payudara.....	10
2.1.5 Stadium Kanker Payudara.....	10
2.1.6 Faktor Resiko Kanker Payudara	12
2.1.7 Patofisiologi Kanker Payudara.....	14
2.1.8 Klasifikasi Kanker Payudara	17
2.1.8.1 Karsinoma invasif.....	17
2.1.8.2 Karsinoma Non Invasif	18
2.1.9 Pengobatan Kanker Payudara.....	19
2.2 MCF-7.....	20
2.3 Apoptosis	21
2.4 <i>Cystein Aspartic Protease-9</i> (Caspase-9)	24
2.5 Daun Kelor.....	26
2.5.1 Klasifikasi Daun Kelor.....	26
2.5.2 Morfologi dan Persebaran Daun Kelor.....	27
2.5.3 Kandungan dan Manfaat Daun Kelor.....	27
2.5.4 Daun Kelor sebagai Agen Terapi Kanker.....	31

BAB 3 KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep	34
3.2 Hipotesis Penelitian	36

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian	37
4.2 Populasi Sampel	37
4.2.1 Dosis yang Digunakan dalam Penentuan IC ₅₀	38
4.2.2 Dosis yang Digunakan dalam Uji Ekspresi Caspase-9 dan Apoptosis	41
4.3 Variabel Penelitian	42
4.3.1 Variabel Bebas.....	42
4.3.2 Variabel Terikat	42
4.4 Definisi Operasional	42
4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian	43
4.6 Alat dan Bahan Penelitian	43
4.6.1 Alat dan Bahan Ekstraksi	43
4.6.2 Alat dan Bahan Penentuan Kualitatif Ekstrak	44
4.6.2.1 Flavonoid	44
4.6.2.2 Saponin.....	44
4.6.2.3 Alkaloid	44
4.6.2.4 Tanin.....	44
4.6.2.5 Terpenoid.....	44
4.6.2.6 Fenol.....	45
4.6.3 Alat dan Bahan Kultur Sel MCF-7.....	45
4.6.4 Alat dan Bahan Pemaparan Ekstrak pada Kultur Sel.....	45
4.6.5 Alat dan Bahan Penentuan IC ₅₀	45
4.6.6 Alat dan Bahan Uji Ekspresi Caspase-9.....	46
4.6.7 Alat dan Bahan Uji Apoptosis	46
4.7 Prosedur Penelitian	46
4.7.1 Ekstraksi Daun Kelor (<i>M. oleifera</i>) dengan	

Maserasi	46
4.7.2 Penentuan Kualitatif Fitokimia Daun Kelor	
(<i>M. oleifera</i>).....	47
4.7.2.1 Flavonoid	47
4.7.2.2 Saponin.....	47
4.7.2.3 Alkaloid	48
4.7.2.4 Tanin.....	48
4.7.2.5 Terpenoid.....	48
4.7.2.6 Fenol.....	48
4.7.3 Kultur Sel MCF-7	48
4.7.3.1 Penumbuhan Sel.....	48
4.7.3.2 Pergantian Media	49
4.7.3.3 Pemanenan Sel.....	50
4.7.3.4 Perhitungan Sel.....	50
4.7.3.5 Subkultur Sel.....	51
4.7.4 Pemaparan Ekstrak Daun Kelor (<i>M. oleifera</i>) pada	
kultur sel MCF-7.....	51
4.7.5 Uji Penentuan IC ₅₀ dengan MTT Assay	52
4.7.6 Uji Ekspresi Caspase-9 dengan imunositokimia	52
4.7.7 Uji Apoptosis dengan TUNEL Assay.....	57
4.8 Analisis Data	58
4.9 Kerangka Penelitian	60

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian.....	62
5.3.1 Hasil Ekstraksi dan Uji Fitokimia Ekstrak.....	62
5.3.2 Penentuan IC ₅₀	63
5.3.1 Hasil Ekspresi Caspase-9	67

5.3.2 Hasil Uji Apoptosis	70
5.2 Analisa Data.....	73
5.2.1 MTT 2.....	74
5.2.1.1 Analisis Deskriptif MTT 2.....	74
5.2.1.2 Uji Normalitas MTT 2.....	74
5.2.1.3 Uji Homogenitas MTT 2.....	74
5.2.1.4 Uji <i>Kruskall Wallis</i> MTT 2.....	75
5.2.1.5 Analisis <i>Spearman</i> MTT 2.....	75
5.2.2 Caspase-9.....	75
5.2.2.1 Analisis Deskriptif Indeks Ekspresi Caspase-9.....	75
5.2.2.2 Uji Normalitas Indeks Ekspresi Caspase-9.....	76
5.2.2.3 Uji Homogenitas Indeks Ekspresi Caspase-9.....	76
5.2.2.4 Uji Analisis Varian (ANOVA) Indeks Ekspresi Caspase-9.....	76
5.2.2.5 Uji <i>Post Hoc</i> Indeks Ekspresi Caspase-9.....	76
5.2.2.5 Uji Korelasi Indeks Ekspresi Caspase-9.....	77
5.2.3 Apoptosis	77
5.2.3.1 Analisis Deskriptif Apoptosis	77
5.2.3.2 Uji Normalitas Apoptosis	78
5.2.3.3 Uji Homogenitas Apoptosis	78
5.2.3.4 Uji Analisis Varian (ANOVA) Apoptosis	78
5.2.3.5 Uji <i>Post Hoc</i> Apoptosis.....	78
5.2.3.5 Uji Korelasi Apoptosis	79

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Analisa Hasil	80
6.1.1 Uji Fitokimia Ekstrak.....	80
6.1.2 Penentuan IC ₅₀ dengan MTT Assay	81
6.1.3 Pengaruh Ekstrak Daun Kelor (<i>M. oleifera</i>) terhadap Ekspresi Caspase-9 dan Apoptosis sel MCF-7	82
6.2 Implikasi terhadap Bidang Farmasi.....	85
6.3 Keterbatasan Penelitian	85

BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan	86
7.2 Saran	86

DAFTAR PUSTAKA.....	88
---------------------	----

LAMPIRAN.....	92
---------------	----



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Anatomi Payudara	7
Gambar 2.2 Prevalensi Kanker Payudara di Indonesia..	9
Gambar 2.3 Photomicrographs sel MCF-7	21
Gambar 2.4 Regulasi Caspase 9	26
Gambar 2.5 Daun kelor	26
Gambar 2.6 senyawa dan struktur kimia yang terkandung dalam <i>Moringa oleifera</i>	30
Gambar 4.1 Bagan Desain Penelitian	23
Gambar 5.1 Grafik rata-rata indeks hambatan proliferasi sel MCF-7 MTT 2	65
Gambar 5.2 Kurva dosis ekstrak terhadap hambatan proliferasi sel	66
Gambar 5.3 Pengencatan Imunositokimia Caspase-9 pada sel MCF-7 setelah perlakuan	68
Gambar 5.4 Grafik Pengaruh Dosis Ekstrak Daun Kelor (<i>M. oleifera</i>) terhadap Rata-rata Indeks Ekspresi Caspase-9 pada Sel MCF-7	70
Gambar 5.5 Hasil <i>TUNEL</i> Assay pada sel MCF-7 setelah Perlakuan	71
Gambar 5.6 Grafik Pengaruh Dosis Ekstrak Daun Kelor (<i>M. oleifera</i>) terhadap Rata-rata Indeks Apoptosis pada Sel MCF-7	73

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.1 Estimasi Insiden, Kematian dan prevalensi 5 tahun kanker payudara pada wanita.....	8
Tabel 2.2 Stadium Kanker Payudara	10
Tabel 2.3 Nilai nutrisi daun kelor	28
Tabel 4.1 Pembagian Kelompok Perlakuan MTT 1.....	39
Tabel 4.2 Pembagian Kelompok Perlakuan MTT 2.....	40
Tabel 4.3 Pembagian Kelompok Perlakuan Imunositokimia Caspase-9 .	41
Tabel 4.4 Pembagian Kelompok Perlakuan Apoptosis	41
Tabel 5.1 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Kelor (<i>M. oleifera</i>).....	63
Tabel 5.2 Persentase hambatan proliferasi sel MCF-7 MTT 2.....	64
Tabel 5.3 Rata-rata Indeks Ekspresi Caspase-9 pada Masing-masing Perlakuan.....	69
Tabel 5.4 Rata-rata Indeks Apoptosis pada Masing-masing Perlakuan ..	72
Tabel 5.5 Hasil Signifikansi Uji <i>Post Hoc</i> Caspase-9	77
Tabel 5.6 Hasil Signifikansi Uji <i>Post Hoc</i> Apoptosis.....	79

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Pernyataan Keaslian Tulisan.....	92
Lampiran 2. Keterangan Kelaiakan Etik.....	93
Lampiran 3. Determinasi Daun Kelor (<i>M. oleifera</i>)	94
Lampiran 4. Hasil Pengamatan Uji Fitokimia	95
Lampiran 5. Hasil Pembacaan Absorbansi MTT 1	97
Lampiran 6. Perhitungan Penentuan IC ₅₀ MTT 1.....	97
Lampiran 7. Persentase Hambatan Proliferasi Sel MCF-7.....	99
Lampiran 8. Grafik Rata-rata Indeks Hambatan Proliferasi MCF-7	
MTT 1.....	99
Lampiran 9. Hasil Pembacaan Absorbansi MTT 2.....	100
Lampiran 10. Perhitungan Penentuan IC ₅₀ MTT 2.....	101
Lampiran 11. Penampakan Sel setelah imunositokimia Caspase-9.....	103
Lampiran 12. Hasil Perhitungan Indeks Ekspresi Caspase-9.....	105
Lampiran 13. Penampakan Sel setelah Tunel Assay.....	107
Lampiran 14. Hasil Perhitungan Indeks Apoptosis.....	109
Lampiran 15. Analisa Deskriptif MTT 2	110
Lampiran 16. Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i> MTT 2	110
Lampiran 17. Uji Homogenitas <i>Levene</i> MTT 2.....	112
Lampiran 18. Uji <i>Kruskal Wallis</i> MTT 2	112
Lampiran 19. Analisa <i>Spearman</i> MTT 2	112
Lampiran 20. Analisa Deskriptif Caspase-9	113
Lampiran 21. Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i> Caspase-9.....	114
Lampiran 22. Uji Homogenitas <i>Levene</i> Caspase-9.....	114

Lampiran 23. Analisis Varian (ANOVA) Caspase-9	115
Lampiran 24. Uji <i>Post Hoc</i> Caspase-9	116
Lampiran 25. Uji Korelasi <i>Pearson</i> Caspase-9	117
Lampiran 26. Analisa Deskriptif Apoptosis	118
Lampiran 27. Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i> Apoptosis	118
Lampiran 28. Uji Homogenitas <i>Levene</i> Apoptosis	118
Lampiran 29. Analisis Varian (ANOVA) Apoptosis	119
Lampiran 30. Uji <i>Post Hoc</i> Apoptosis	119
Lampiran 31. Uji Korelasi <i>Pearson</i> Apoptosis	120
Lampiran 32. Dokumentasi Kegiatan	121



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker adalah penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan dan penyebaran sel-sel abnormal yang tidak terkendali. Jika penyebarannya tidak dikontrol, dapat mengakibatkan kematian (*American Cancer Society*, 2013). Kanker merupakan masalah kesehatan masyarakat yang utama di Amerika Serikat dan banyak negara lainnya. Satu dari 4 kematian di Amerika Serikat adalah karena kanker (Siagel *et al*, 2013). Salah satu jenis kanker yang memiliki prevalensi tinggi adalah kanker payudara. Pada tahun 2013 diprediksi terjadi 232.340 kasus baru kanker payudara invasif dan 39.620 diantaranya mengakibatkan kematian pada perempuan di Amerika Serikat (DeSantis *et al.*, 2013). Di Indonesia, kanker payudara merupakan kanker yang memiliki prevalensi tertinggi pada perempuan yakni sebesar 25% dari seluruh kejadian kanker dengan jumlah insiden sebanyak 39.831 kasus dan 20.052 diantaranya berakhir dengan kematian (Globacon, 2008).

Penyebab pasti dari kanker payudara masih belum diketahui, banyak faktor yang dapat meningkatkan kemungkinan terjadinya kanker payudara pada wanita, seperti faktor hormonal, genetika, lingkungan dan pengaruh gaya hidup (Chilshom-Burnet *al.*, 2008). Pada faktor genetika bisa terjadi karena defek gen BRCA1 dan BRCA2. Selain itu, pada kanker payudara juga terjadi kelainan yang dapat meningkatkan aktivitas proliferasi sel dan juga kelainan pada penurunan atau hilangnya regulasi kematian sel (Indrati dkk, 2005). Untuk menghilangkan sel-sel yang abnormal maka sel mengalami apoptosis. Pada apoptosis jalur

intrinsik, *Cysteine aspartyl protease-9* (caspase-9) memainkan peran sentral dalam mitokondria yang terlibat dalam banyak respon rangsangan apoptosis (Allan dan Paul, 2009).

Selama ini pengobatan yang dilakukan untuk mengatasi kanker payudara yakni dengan melakukan pembedahan, radioterapi, kemoterapi dan menggunakan obat-obatan. Namun demikian, pengobatan tersebut banyak menimbulkan efek samping seperti hilangnya payudara, limfoedema pada lengan, penyakit kardiovaskuler, gangguan fungsi seksual jangka panjang, dan kemandulan (NHMRC, 2001). Oleh karena itu, masih perlu dicari pengobatan lain yang lebih aman dan tidak banyak menimbulkan efek samping obat.

Sementara itu, produk alam termasuk tanaman, hewan dan mineral telah menjadi dasar pengobatan penyakit manusia. Penggunaan produk herbal merupakan salah satu pengobatan yang dianggap lebih aman dibandingkan produk senyawa kimia. Berdasarkan ethnomedicine Ayurveda, salah satu tanaman yang telah terbukti berkhasiat sebagai anti kanker adalah daun kelor (*Moringa oleifera*), yang banyak digunakan pada pengobatan tradisional di India (Balachandran dan Rajgopal, 2005).

Daun kelor (*M. oleifera*) merupakan tanaman yang tersebar di daerah tropis termasuk Indonesia, terutama banyak terdapat di Madura. Daun kelor dapat berfungsi sebagai anti tumor, anti inflamasi, anti ulcer, anti arterosklerosis dan anti konvulsan (Shahriar *et al.*, 2012). Daun kelor juga digunakan untuk mengobati sakit kepala, ambeien, demam, sakit tenggorokan, bronkitis, infeksi mata dan telinga, kudisan, radang selaput lendir di hidung dan tenggorokan dan juga sebagai pencahar (Anwar *et al.*, 2006).

Daun kelor (*M. oleifera*) mengandung tiokarbamat seperti niamicin yang merupakan agen kemopreventif, quercetin-3-O-glukosid dan kaempferol-3-O-glikosida yang berperan sebagai antioksidan, secara tidak langsung meningkatkan aktivitas dari caspase-9 pada sel (Manguro and Lemmen, 2007). Quercetin mengaktifkan jalur mitokondria, pelepasan sitokrom c, aktivasi caspase-9, menghambat protein anti-apoptosis Bcl-2 dan mengaktifkan pro-apoptosis seperti Bax dan Bad (Granado-Serrano *et al.*, 2006). Senyawa glikosida, glukosinolat serta beta-sitosterol, yang menunjukkan adanya sifat anti-kanker (Berkovic *et al.*, 2013), daun kelor juga mengandung benzil isotiosianat (Fahey, 2005) yang diketahui dapat menginduksi apoptosis, mengaktifkan caspase-9 (Miyoshi *et al.*, 2004). Dari beberapa penelitian diketahui bahwa rata-rata IC₅₀ yang optimal dalam menghambat proliferasi ataupun menginduksi apoptosis dari ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) menggunakan pelarut etanol yakni pada rentang konsentrasi kurang dari 300 µg/mL (Saetung *et al.*, 2005; Shahriar, 2012; Hermawan *et al.*, 2012; Pamok *et al.*, 2012).

Dikarenakan belum ada penelitian mengenai dosis daun kelor (*M. oleifera*) pada sel MCF-7 maka penelitian ini akan melakukan pencarian IC₅₀ dengan seri dosis dan dosis kelipatan 50. Berdasarkan fakta diatas, ekspresi caspase-9 dapat ditingkatkan melalui senyawa kimia yang terdapat pada daun kelor sehingga memungkinkan terjadinya apoptosis pada MCF-7. Oleh karena itu, maka diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dalam perubahan ekspresi caspase-9 pada apoptosis cell-line kanker payudara MCF-7 secara *in vitro*.

1.2 Rumusan Masalah

1. Berapakah nilai *Inhibitor Concentration 50* (IC_{50}) ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) terhadap proliferasi sel MCF-7?
2. Apakah ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dapat meningkatkan ekspresi caspase-9 pada sel MCF-7?
3. Apakah ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dapat menginduksi apoptosis sel MCF-7?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa ekstrak daun kelor dapat meningkatkan ekspresi caspase-9 dan meningkatkan apoptosis pada sel MCF-7.

1.3.2 Tujuan Khusus

- 1) Untuk mengetahui nilai *Inhibition Concentration 50%* (IC_{50}) ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) terhadap proliferasi sel MCF-7
- 2) Untuk menganalisis hubungan konsentrasi ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) terhadap peningkatan ekspresi caspase-9 pada sel MCF-7
- 3) Untuk menganalisis hubungan konsentrasi ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) terhadap peningkatan apoptosis sel MCF-7

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Penelitian ini dapat dijadikan landasan teori untuk memberikan informasi tentang kemampuan senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) sebagai alternatif terapi dalam mengatasi kanker payudara yang efektif di masa mendatang. Serta bagi peneliti, dapat

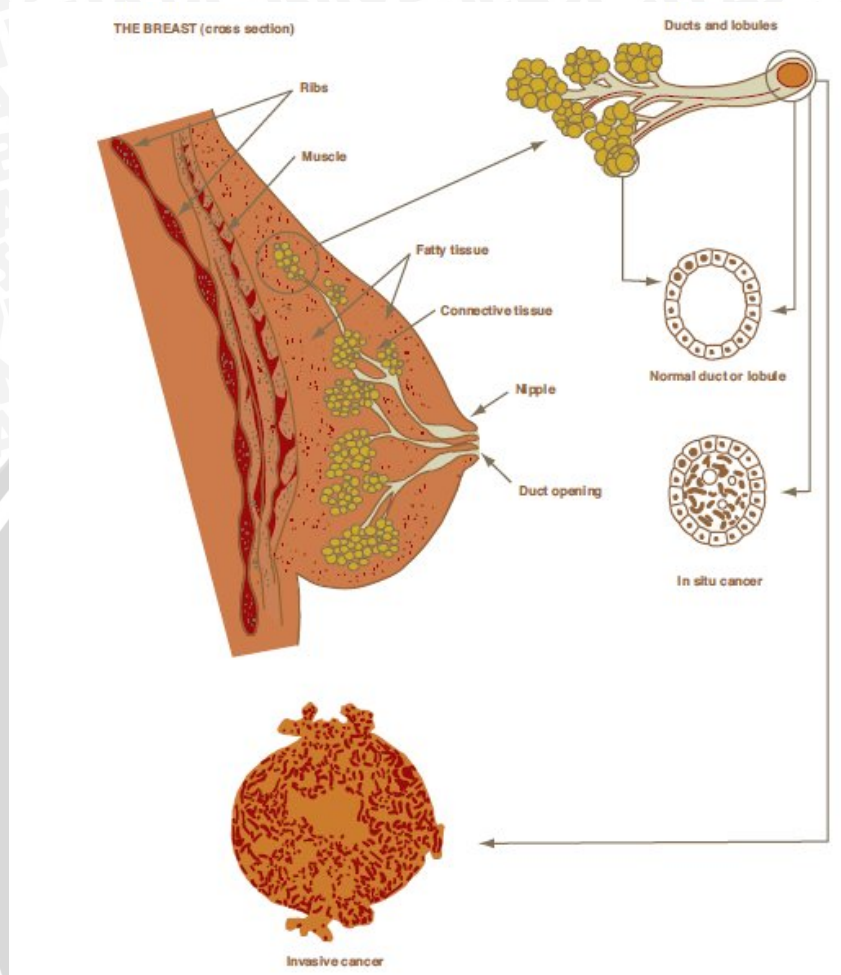
menambah wawasan, pembelajaran dalam pengembangan gagasan penelitian dan motivasi penulis untuk berpikir kritis dalam memberikan penjelasan secara ilmiah mengenai efek ekstrak daun kelor (*M.oleifera*) sebagai alternatif terapi kanker payudara.

1.4.2 Manfaat Praktis

Penelitian ini diharapkan memberikan kontribusi dasar penelitian mengenai pengaruh ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) pada peningkatan ekspresi caspase-9 dan apoptosis sel MCF-7 yang dapat dikembangkan ke penelitian-penelitian selanjutnya. Selain itu, bagi klinisi, farmasis ataupun masyarakat, penelitian ini dapat dijadikan sebagai bahan pertimbangan untuk menggunakan daun kelor (*M. oleifera*) sebagai terapi pendamping untuk pasien kanker payudara .

BAB 2**TINJAUAN PUSTAKA****2.1 Kanker Payudara****2.1.1 Definisi Kanker Payudara**

Kanker merupakan penyakit dengan pertumbuhan dan penyebaran sel-sel abnormal yang tidak terkendali. Apabila penyebarannya tidak dikontrol, maka dapat mengakibatkan kematian. Kanker disebabkan oleh faktor eksternal (tembakau, organisme menular, bahan kimia, dan radiasi) dan faktor internal (mutasi gen, hormone) (*American Cancer Society*, 2013). Kanker payudara adalah kanker yang terdapat di jaringan payudara. Tipe kanker payudara yang paling sering muncul adalah karsinoma duktus yang terdapat pada lapisan saluran payudara (saluran yang membawa susu dari lobul menuju puting). Selain itu terdapat pula karsinoma lobular, yaitu kanker yang terjadi di lobul payudara (kelenjar susu) (NCI, 2013).



Gambar 2.1 Anatomi Payudara (Dipiro *et al.*, 2008)

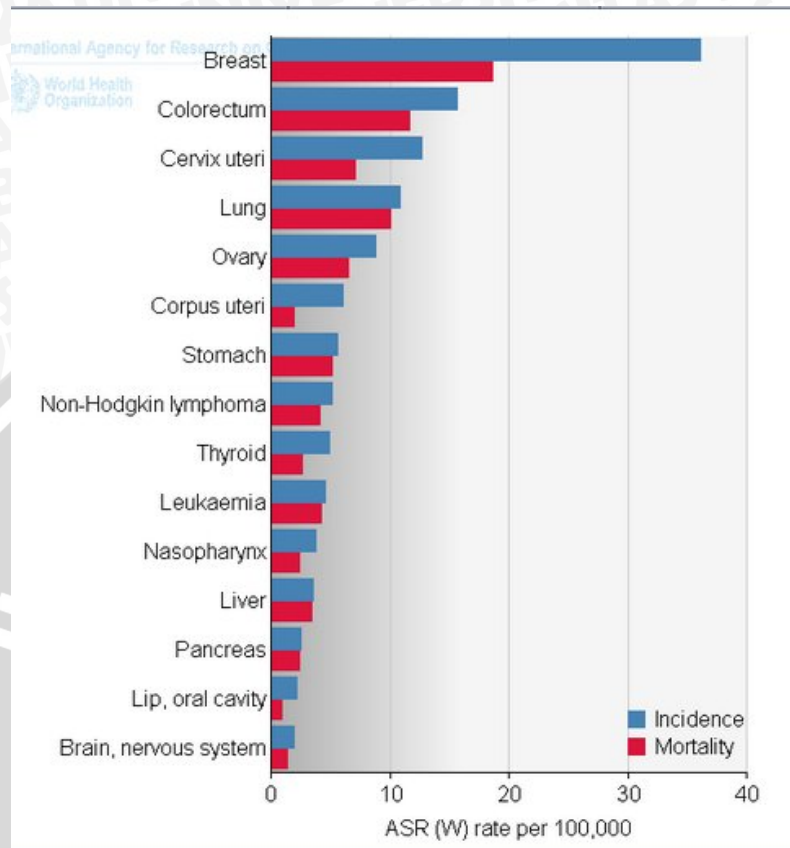
2.1.2 Epidemiologi Kanker Payudara

Di Amerika Serikat, kanker merupakan masalah kesehatan masyarakat yang utama. Satu dari 4 kematian di Amerika Serikat adalah karena kanker (Siagel *et al.*, 2013). Kanker payudara merupakan salah satu jenis kanker yang memiliki prevalensi tinggi. Di Amerika Serikat, pada tahun 2013 diprediksi terjadi 232.340 kasus baru kanker payudara invasif pada perempuan dan 39.620 diantaranya mengakibatkan kematian (DeSantis *et al.*, 2013). Sama halnya

dengan Indonesia, 25% dari seluruh kejadian kanker pada perempuan merupakan kanker payudara dengan jumlah insiden sebanyak 39.831 kasus dan 20.052 diantaranya berakhir dengan kematian (Globacon, 2008).

Tabel 2.1 Estimasi Insiden, kematian dan prevalensi 5 tahun kanker payudara pada wanita (Globacon, 2008):

Cancer	Incidence			Mortality			5-year prevalence		
	Number	(%)	ASR (W)	Number	(%)	ASR (W)	Number	(%)	Prop.
Lip, oral cavity	2310	1.5	2.1	990	0.9	0.9	5198	1.4	6.2
Nasopharynx	4230	2.7	3.8	2564	2.5	2.4	11043	2.9	13.3
Other pharynx	619	0.4	0.6	506	0.5	0.5	1374	0.4	1.6
Oesophagus	1219	0.8	1.2	1156	1.1	1.1	1080	0.3	1.3
Stomach	5973	3.8	5.6	5542	5.3	5.2	7647	2.0	9.2
Colorectum	16413	10.5	15.6	12285	11.8	11.6	34164	9.1	41.0
Liver	3677	2.3	3.5	3561	3.4	3.5	2066	0.5	2.5
Gallbladder	1749	1.1	1.6	1692	1.6	1.6	1883	0.5	2.3
Pancreas	2647	1.7	2.5	2569	2.5	2.4	1806	0.5	2.2
Larynx	369	0.2	0.4	207	0.2	0.2	944	0.3	1.1
Lung	11509	7.4	10.9	10680	10.2	10.1	9500	2.5	11.4
Melanoma of skin	362	0.2	0.3	192	0.2	0.2	961	0.3	1.1
Breast	39831	25.5	36.2	20052	19.2	18.6	139012	36.9	166.9
Cervix uteri	13762	8.8	12.6	7493	7.2	7.0	38868	10.3	46.7
Corpus uteri	6332	4.0	6.1	1936	1.9	1.9	24072	6.4	28.9
Ovary	9664	6.2	8.8	7031	6.7	6.6	23773	6.3	28.5
Kidney	1983	1.3	1.8	1547	1.5	1.5	4086	1.1	4.9
Bladder	1600	1.0	1.5	1010	1.0	1.0	4089	1.1	4.9
Brain, nervous system	2156	1.4	1.9	1568	1.5	1.4	3078	0.8	3.7
Thyroid	5643	3.6	4.9	2718	2.6	2.6	21583	5.7	25.9
Hodgkin lymphoma	897	0.6	0.8	704	0.7	0.6	2514	0.7	3.0
Non-Hodgkin lymphoma	5535	3.5	5.1	4392	4.2	4.1	8885	2.4	10.7



Gambar 2.2. Prevalensi kanker payudara di Indonesia (globocan, 2008).

2.1.3 Etiologi Kanker Payudara

Penyebab dari kanker payudara masih belum diketahui. Faktor yang dapat meningkatkan kemungkinan terjadinya kanker payudara pada wanita adalah faktor hormonal, genetika (terutama karena defek gen BRCA1 dan BRCA2), faktor lingkungan, pengaruh gaya hidup, dan terjadi kelainan yang dapat meningkatkan aktivitas proliferasi sel dan juga kelainan pada penurunan atau hilangnya regulasi kematian sel (Chilshom-Burnet *al.*, 2008; Indrati dkk, 2005).

2.1.4 Tanda dan gejala Kanker Payudara

Kanker payudara biasanya tidak menunjukkan adanya gejala ketika tumor masih kecil. Oleh karena itu, penting halnya untuk wanita direkomendasikan melakukan skrining untuk mendeteksi adanya kanker payudara pada stadium awal. Pada tumor yang lebih besar terjadi perubahan massa payudara, dan sering menyakitkan. Gejala yang kurang umum terjadi yakni perubahan payudara secara persisten seperti penebalan, pembengkakan, nyeri, iritasi kulit, kemerahan. Nyeri pada payudara juga disebabkan oleh kondisi kanker yang jinak dan bukan merupakan gejala awal umum dari kanker payudara (American Cancer Society, 2013).

2.1.5 Stadium Kanker Payudara

Stadium kanker payudara dibagi menjadi seperti berikut (Chilshom-Burnet *al.*, 2008):

Tabel 2.2 Stadium Kanker Payudara

Stage	Grouping		
0	T _{is}	N ₀	M ₀
I	T ₁ ^a	N ₀	M ₀
IIA	T ₀	N ₁	M ₀
	T ₁ ^a	N ₁	M ₀
IIB	T ₂	N ₀	M ₀
	T ₂	N ₁	M ₀
IIIA	T ₃	N ₀	M ₀
	T ₀	N ₂	M ₀
	T ₁ ^a	N ₂	M ₀
	T ₂	N ₂	M ₀
IIIB	T ₃	N ₁	M ₀
	T ₃	N ₂	M ₀
	T ₂	N ₀	M ₀
	T ₂	N ₁	M ₀
IIIC	T ₂	N ₂	M ₀
	Any T	N ₃	M ₀
IV	Any T	Any N	M ₁

Keterangan:

A. T: Tumor

- T0 = Tidak ada bukti tumor
- Tis= Karsinoma in situ
- T1= kurang dari atau sama dengan 2 cm
- T2= lebih besar dari 2-5 cm
- T3= lebih besar dari 5 cm
- T4= Setiap ukuran , ekstensi langsung ke dinding dada (termasuk otot dada) atau kulit infiltrasi

B. Kelenjar getah bening regional (pN)

- PNX= Daerah kelenjar getah bening tidak dapat dinilai
- PN0= ada daerah kelenjar getah bening metastasis secara histology
- PN1= Metastasis pada 1-3 kelenjar getah bening aksila , dan / atau dalam nodus internal mammary dengan terdeteksi penyakit mikroskopis oleh sentinel diseksi kelenjar getah bening , tetapi tidak tampak secara klinis *
- PN2= Metastasis pada 4-9 kelenjar getah bening aksila atau secara klinis jelas terlihat internal kelenjar getah bening payudara dengan tidak adanya metastasis kelenjar getah bening aksila
- PN3= Metastasis dalam sepuluh atau lebih kelenjar getah bening aksila, atau dalam infraklavikula kelenjar getah bening , atau secara klinis jelas ipsilateral internal kelenjar getah bening payudara dengan adanya 1 atau lebih kelenjar getah bening aksila positif, atau lebih dari 3 kelenjar getah bening aksila dengan klinis metastasis mikroskopis

negatif dalam internal kelenjar getah bening payudara, atau kelenjar getah bening supraklavikula ipsilateral

C. Metastasis (M)

- M0=Tidak metastasis ke organ lain yang berjauhan atau ke nodus limfa yang jauh dari payudara.
- M1= metastasis ke organ lain yang berjauhan atau ke nodus limfa yang jauh dari payudara.

2.1.6 Faktor resiko Kanker Payudara

Banyak faktor resiko yang dapat menyebabkan terjadinya kanker payudara, yakni:

1. Usia

50% wanita penderita kanker payudara tidak memiliki faktor resiko lain selain usia (Brashers, 2007). Resiko terkena kanker payudara meningkat seiring bertambahnya usia. Sekitar 1 dari 8 kanker payudara invasif ditemukan pada wanita yang lebih muda dari 45 tahun, sementara sekitar 2 dari 3 kanker payudara invasif ditemukan pada wanita usia 55 tahun atau lebih (*American Cancer Society*, 2013).

2. Riwayat Keluarga

Resiko kanker payudara meningkat 1,4-13,6 kali jika memiliki saudara tingkat pertama yang menderita kanker payudara. Resiko dapat meningkat apabila saudara yang menderita kanker payudara didiagnosis pertama kali pada usia muda (Brashers, 2007).

3. Genetika

Sekitar 5%-10% kasus kanker payudara disebabkan mutasi genetik yang diturunkan dari orang tua. Gen *breast cancer 1, early onset* (BRCA1) dan *breast cancer 2, early onset* (BRCA2) merupakan gen yang paling banyak terlibat dalam kanker payudara. Mutasi BRCA1 menyebabkan peningkatan resiko 55-65% terkena kanker payudara, sedangkan mutasi BRCA2 menyebabkan peningkatan resiko 45% (*American Cancer Society*, 2013).

4. Reproduksi / Hormonal

- a. Menarke awal (12 tahun) atau Menopause lambat (>55 tahun)
- b. Nuliparitas atau kehamilan pertama terlambat (>30 tahun)
- c. Kadar estradiol serum berkorelasi dengan resiko kanker payudara pada wanita pra atau pascamenopause
- d. Penggantian estrogen pascamenopause
- e. Penggunaan kontrasepsi oral sebelum tahun 1975 meningkatkan resiko; tidak ada bukti bahwa penggunaan kontrasepsi oral yang terkini mengandung resiko, hal ini dikarenakan pada sediaan lama mengandung estrogen dosis tinggi.

5. Lingkungan

- a. Diet lemak: masih kontroversial; data terbaru tetap menunjukkan bahwa obesitas merupakan faktor resiko (Brashers, 2007). Jaringan lemak menghasilkan kelebihan jumlah estrogen, selain itu pada orang obesitas sering mengalami peningkatan kadar insulin dan *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) dalam darah yang dapat meningkatkan perkembangan tumor. Sel lemak juga memproduksi hormon adipokin

dan leptin. Hormon adipokin dapat merangsang atau menghambat pertumbuhan sel dan hormon leptin dapat mempromosikan proliferasi sel (NCI, 2012).

- b. Merokok : data menunjukkan bahwa nikotin dan N-nitrosamin (karsinogen) dalam asap rokok) terkonsentrasi dalam jaringan payudara, dan bahwa wanita perokok pascamenopause dengan polimorfisme gen yang bertanggung jawab untuk mendetoksifikasi karsinogen tersebut (asetilator lambat) beresiko tinggi untuk menderita kanker payudara (Brashers, 2007).
 - c. Alkohol: Resiko kanker payudara meningkat jika mengkonsumsi alkohol lebih dari 30-60 gram/hari (Brashers, 2007).
 - d. Lainnya masih dipelajari termasuk hidrokarbon aromatik polisiklik (polusi bahan bakar minyak fosil), amina heterosiklik (daging yang dimasak terlalu matang), dan radiasi pengion (resiko terbesar bila terpajan pada usia kurang dari 19 tahun) (Brashers, 2007).
6. Riwayat kanker payudara sebelumnya
- pada kanker payudara kontralateral (kanker payudara pada bagian lain payudara yang didiagnosis lebih dari 6 bulan setelah deteksi kanker pertama). 47% kasus akan mengalami karsinoma in situ dengan 1 % per tahun berkembang menjadi karsinoma invasif (Brashers, 2007).

2.1.7 Patofisiologi Kanker Payudara

Proses terjadinya kanker terjadi melalui beberapa tingkat, yaitu (Tjay dan Kirana, 2008):

- 1). Fase inisiasi: DNA dirusak akibat radiasi atau zat karsinogen (radikal bebas). Karsinogen mengganggu proses repair DNA, sehingga terjadi mutasi DNA dengan kelainan pada kromosomnya. Kerusakan DNA diturunkan kepada anak-anak sel dan seterusnya.
- 2). Fase Promosi: Zat karsinogen tambahan (co-carcinogen) diperlukan sebagai promotor untuk mencetuskan proliferasi sel. Dengan demikian sel-sel rusak menjadi ganas
- 3). Fase Progresi: Gen-gen pertumbuhan yang diaktivasi oleh kerusakan DNA mengakibatkan mitosis dipercepat dan pertumbuhan tak terkendali dari sel-sel ganas.

Sel-sel tumor dapat mereplikasi gen-gennya sampai 10.000 kali lebih cepat dari pada sel normal. Oleh karena itu berbagai mutasi dapat berlangsung secara bersamaan. Pada orang sehat, sel-sel yang rusak dikenal oleh limfosit sebagai sel asing dan dimusnahkan. Namun, bila sistem imun terganggu, sel-sel yang termutasi itu dibiarkan berkembang menjadi sel kanker yang kemudian berproliferasi. Sel membelah dalam beberapa fase selama siklusnya, yang rata-rata memakan waktu sekitar 20 jam (Tjay dan Kirana, 2008).

Pada kanker payudara, evaluasi patologis lesi payudara berfungsi untuk diagnosis histologist dan untuk mengkonfirmasi ada atau tidaknya faktor lain yang diyakini mempengaruhi prognosis. Faktor prognosis ini termasuk adanya nekrosis, invasi getah bening atau pembuluh darah, *nuclear grade*, status reseptor hormon, indeks proliferasi, jumlah aneuploidi, dan ekspresi HER-2/neu (*human epidermal growth factor receptor 2*) (Chilshom-Burnet *et al.*, 2008).

Kanker payudara dapat terjadi karena mutasi gen BRCA. BRCA1 dan BRCA2 merupakan *tumor suppressor gene*, mutasi familial gen BRCA terjadi pada sekitar 5% kasus kanker payudara di Amerika Serikat setiap tahun. BRCA1 berperan dalam tiga hal yakni aktivasi respons terhadap kerusakan DNA, aktivasi *checkpoint* siklus sel dan/atau perbaikan kerusakan DNA tipe *double strand break* (DSB). BRCA1 berperan agar sel yang mengalami kerusakan DNA tidak berlanjut ke siklus pembelahan sel. Peran BRCA2 terutama pada reparasi DNA dengan mekanisme rekombinasi homolog (*homologous recombinant* [HR]) (Romadhon, 2013).

Estrogen dan progesteron juga mempengaruhi terjadinya kanker payudara. Estrogen mengatur produksi faktor pertumbuhan dan ekspresi reseptor. Estrogen diperlukan untuk fungsi sel payudara normal dan menyebabkan pematangan dan proliferasi payudara. Penurunan estrogen, seperti pada menopause mengakibatkan sel payudara apoptosis. Pada sel neoplastik, stimulasi reseptor estrogen (ER) menyebabkan ekspresi berlebihan produksi faktor pertumbuhan dan / atau reseptor mengakibatkan proliferasi sel yang tidak terkontrol. 60% tumor primer dianggap ER positif. Banyak tumor juga memiliki reseptor progesteron (PR). Tumor ini memiliki kecepatan pertumbuhan yang lebih lambat, prognosis dan responnya lebih baik terhadap terapi manipulasi hormon dari pada tumor ER / PR. Tumor ER negatif terjadi akibat metilasi (penambahan radikal metil) DNA (secara eksperimental, penghambatan metilasi dapat mengembalikan reseptor estrogen) dan mampu menstimulasi autokrin estrogen secara mandiri, sehingga resisten terhadap terapi endokrin dan cenderung menjadi tumor yang lebih agresif (Brashers, 2007).

Reseptor progesteron juga ditemukan pada sel normal dan pada 50% tumor ER positif, tumor ini yang paling responsif terhadap terapi endokrin. Selain itu banyak faktor pertumbuhan yang juga berperan dalam kanker payudara. Faktor pertumbuhan serupa insulin 1 (IGF1) penting untuk pertumbuhan payudara tetapi juga merupakan mitogen untuk sel kanker dan mendorong pertumbuhan *independen-anchorage*. Faktor pertumbuhan serupa insulin 2 (IGF2) meregulasi aktivitas IGF1, reseptor untuk faktor pertumbuhan ini ditemukan pada tumor ER positif dan menunjukkan peningkatan responsivitas terhadap terapi endokrin. Faktor pertumbuhan epidermal (EGF) menyebabkan peningkatan mitosis dan resistensi terhadap tamoksifen dan meningkatkan ekspresi HER2/ neu (terdapat pada 20-30% tumor payudara) (Brashers, 2007).

2.1.8 Klasifikasi Kanker Payudara

2.1.8.1 Karsinoma invasif

Kebanyakan karsinoma payudara adalah adenocarcinoma dan diklasifikasikan berdasarkan penampakan mikroskopis baik duktal atau lobular, sesuai dengan saluran dan lobul payudara normal. Jenis karsinoma invasif yakni karsinoma duktus invasif, karsinoma lobular invasif. Karsinoma duktus invasif merupakan bentuk paling umum yang sering terjadi yakni sekitar 75 % dari semua kanker payudara invasif. Tumor ini biasanya menyebar ke kelenjar getah bening aksila dan prognosisnya lebih rendah dari pada jenis histologis lainnya (khusus tubular, meduler , dan mucinous). Karsinoma lobular invasif terjadi sekitar 5 % sampai 10 % dari tumor payudara. Karsinoma lobular invasif sulit untuk dideteksi oleh mamografi. Karsinoma duktal invasif lebih sering bermetastasis ke tulang, hati, paru-paru,

atau otak. Sedangkan karsinoma lobular invasif cenderung bermetastasis ke leptomeninges, permukaan peritoneal, retroperitoneum, saluran cerna, organ reproduksi. Tiga tipe yang paling umum terjadi pada kanker invasif adalah meduler, mucinous, dan tubular. Jumlah karsinoma meduler kurang dari 7% dari seluruh karsinoma payudara, karsinoma mucinous (atau koloid) terjadi sekitar 3%, dan karsinoma tubular terjadi sekitar 2% dari semua kanker payudara (Dipiro *et al.*, 2008).

2.1.8.2 Karsinoma non invasif

Karsinoma non invasif ada dua yakni *Ductal carcinoma in situ* (DCIS) dan *Lobular carcinoma in situ* (LCIS). DCIS lebih sering terjadi dari pada LCIS. Tujuan utama dari pengobatan untuk karsinoma non-invasif adalah untuk mencegah perkembangan penyakit invasif. Pengobatan DCIS tergantung pada lokasi, ukuran, dan pathologi. Pilihan pengobatan meliputi eksisi lokal, eksisi lokal yang diikuti oleh iradiasi payudara, dan tradisional mastektomi total dengan rekonstruksi. Iradiasi seluruh payudara dianjurkan bersama eksisi yang secara signifikan dapat mengurangi risiko kekambuhan lokal. Eksisi dengan margin negatif saja, tanpa radiasi dapat dipertimbangkan pada pasien dengan DCIS kecil ($< 0,5$ cm), lokal, dan stadium rendah. Mastektomi telah menjadi pengobatan standar DCIS selama beberapa dekade. Jika lebih dari satu area payudara terkena DCIS, mastektomi adalah pilihan yang disukai. Konservasi payudara mungkin tidak sesuai untuk wanita muda yang risiko kanker payudara tinggi termasuk pembawa mutasi BRCA1 atau BRCA2 (Dipiro *et al.*, 2008).

2.1.9 Pengobatan Kanker Payudara

Pengobatan untuk mengatasi kanker payudara yakni (*American Cancer Society*, 2013). :

1. Pembedahan

Pembedahan yang dapat dilakukan seperti operasi konservasi payudara (mastektomi sebagian), mastektomi, operasi kelenjar getah bening. Efek samping yang dapat terjadi yakni nyeri, pembengkakan, pendarahan, dan kemungkinan infeksi.

2. Terapi radiasi

Terapi radiasi merupakan pengobatan dengan sinar berenergi tinggi yang menghancurkan sel-sel kanker. Radiasi pada payudara seringkali diberikan setelah operasi konservasi payudara untuk membantu menurunkan kemungkinan terjadinya kanker kembali. Radiasi juga mungkin dianjurkan setelah mastektomi pada pasien dengan kanker lebih besar dari 5 cm, atau bila kanker ditemukan dikelenjar getah bening. Efek samping jangka pendek utama terapi radiasi sinar eksternal adalah pembengkakan pada payudara, perubahan kulit dan kelelahan.

3. Kemoterapi

Kemoterapi yang dapat digunakan seperti doxorubicin, paclitaxel, cyclophosphamide. Efek samping yang dapat terjadi yakni rambut rontok, sariawan, kehilangan nafsu makan atau nafsu makan meningkat, mual dan muntah, jumlah sel darah rendah, kerusakan jantung, neuropati, meningkatnya kemungkinan infeksi, mudah memar atau pendarahan, kelelahan.

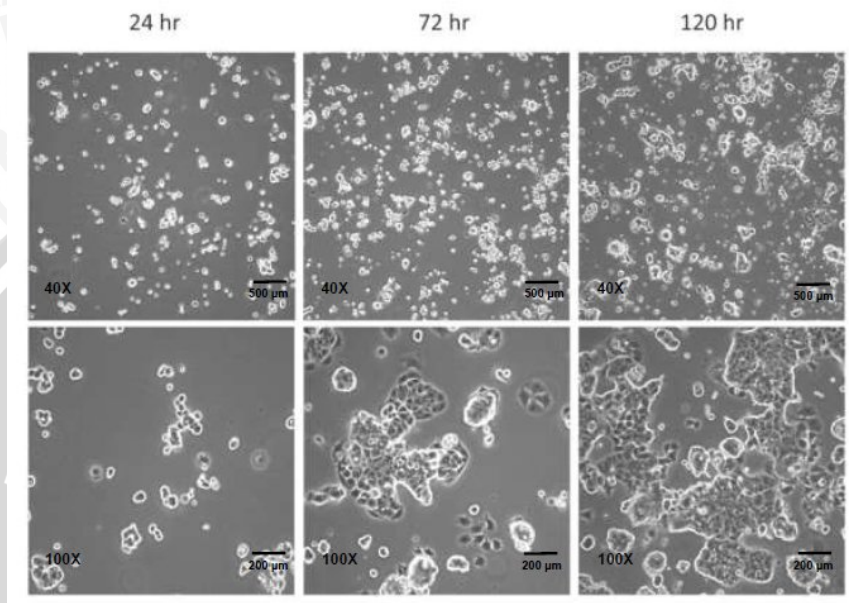
4. Terapi Hormon

Terapi hormone adalah bentuk lain dari terapi sistemik yang paling sering digunakan sebagai terapi adjuvant untuk membantu mengurangi risiko kanker datang kembali setelah operasi, tetapi hormon juga dapat digunakan sebagai pengobatan neoadjuvant. Hal ini juga digunakan untuk mengobati kanker yang telah kembali setelah pengobatan atau telah menyebar. Contoh terapi yang digunakan adalah tamoxifen yang kerjanya memblokir reseptor estrogen pada sel kanker payudara.

2.2 MCF-7

MCF-7 merupakan sel kanker payudara yang mengekspresikan reseptor estrogen (ER +) dengan galur murni *p53* sehingga sensitif terhadap agen kemoterapi (Jeni dan Edi, 2009). Sel MCF-7 adalah sel yang umum digunakan untuk menguji efek kanker payudara secara *in vitro* karena bentuk selnya terbaik dari semua jenis sel kanker payudara manusia. Sel MCF-7 tergolong dalam jenis *cell-line adherent* yang akan tumbuh melekat dimana sel tersebut mengekspresikan reseptor estrogen, ekspresi berlebih Bcl-2. Sel MCF-7 tidak mengekspresikan caspase-3 (Prunet *et al.*, 2005), serta resisten terhadap agen kemoterapi seperti doxorubicin (Zampieri *et al.*, 2002). Sel MCF-7 merupakan sel yang menyerupai sel epitel yang tumbuh secara monolayer dan diambil dari tempat efusi pleural metastasis kanker payudara pada penderita kanker payudara. Biakan sel MCF-7 memiliki beberapa karakteristik pada epitel mamari yang berbeda termasuk dalam kemampuannya untuk memproduksi estradiol via reseptor sitoplasma dan kesanggupannya untuk membentuk *dome*. Dalam

pertumbuhannya, sel ini akan membentuk kultur selapis pada labu kultur dan ditumbuhkan dalam medium DMEM (Widowati dan Harfia, 2009).



Gambar 2.3 Photomicrograph sel MCF-7 pada berbagai waktu setelah penanaman dengan kepadatan sel 4×10^4 cells/cm² (ATCC, 2012).

2.3 Apoptosis

Apoptosis adalah cara kematian sel yang digunakan oleh organism multi sel untuk membuang sel-sel yang tidak diinginkan. Apoptosis ditandai oleh serangkaian gangguan arsitektur seluler yang berkontribusi tidak hanya untuk kematian sel, tetapi juga menyiapkan sel untuk dihilangkan oleh fagosit dan mencegah respon imun yang tidak diinginkan. Sel-sel yang mengalami apoptosis dapat segera dikenal oleh fagosit karena berbeda dari sel lain. Banyak fase penghancuran apoptosis diatur oleh kelompok protease sistein yang dikenal sebagai caspase. Caspase biasanya terdapat dalam sel-sel sehat sebagai enzim precursor tidak aktif (zymogens) dengan sedikit atau tanpa aktifitas protease.

Protease ini menargetkan protein untuk membatasi proteolisis secara terkontrol yang meminimalkan kerusakan dan gangguan terhadap sel tetangga dan menghindari pelepasan molekul imunostimulan (Taylor *et al.*, 2008).

Proses apoptosis dan proliferasi sel kanker juga dipengaruhi oleh protein HSP27, HSP70, NF- κ B, TLR-4. Hsp27 merupakan regulator negatif apoptosis jalur mitokondria yang dapat memblok kematian sel pada level yang berbeda, yaitu pada tahap pre-mitokondria, dengan menghambat stres yang menginduksi signaling; pada level mitokondria, dengan mencegah permeabilisasi membran mitokondria melalui blokade translokasi Bax; dan pada level post-mitokondria, dengan berinteraksi dengan AIF dan Apaf-1. Hsp27 juga berpengaruh pada level reseptor kematian karena stimulasi CD95/Fas. Dua target protein Hsp27 adalah NF- κ B *inhibitor* I- κ B α dan *cyclin-dependent kinase inhibitor* p27^{kip1}. NF- κ B terlibat dalam ekspresi protein antiapoptosis, seperti Bcl-2, Bcl-xl and c-IAPs (R  roleet *al.*, 2010). Peningkatan level protein Hsp27 pada jaringan kanker dapat disebabkan karena mutasi pada faktor transkripsi, seperti *heat shock transcriptional factor-1* (HSF-1) (Kanagasabai *et al.*, 2011). Hsp70 adalah salah satu Hsp yang memiliki properti sitoprotektif paling kuat. Ekspresi berlebihan Hsp70 dapat mencegah kematian sel yang dipicu oleh berbagai macam stimulus, seperti hipertermia, stress oksidatif, penghambatan tirosin kinase oleh staurosporin, ligasi reseptor kematian sel Fas/Apo-1/CDC95 atau adanya obat-obatan sitotoksik (Cecconi, 2010).

NF- κ B diketahui berpengaruh dalam pertumbuhan tumor, hal ini berdasarkan kemampuan NF- κ B dalam meningkatkan regulasi produksi sitokin dan enzim proinflamasi, termasuk TNF- α , IL-1, IL-6 dan COX-2. NF- κ B juga mengatur ekspresi banyak gen yang produknya dapat menekan kematian sel

tumor, meningkatkan epitel untuk transisi mesenchymal (yang memiliki peran penting dalam invasi tumor), dan merangsang perkembangan siklus sel tumor (Khiong, 2010). NF κ B merupakan efektor dari sistem signaling yang paling banyak dimediasi oleh *tumor necrosis factor receptor* (TNFR) dan *toll like receptor* (TLR), selain itu juga penginduksi metabolik atau genotoksik stress (O'Dea, 2009). Dalam menghasilkan respon inflamasi, TLRs umumnya bergantung pada protein adaptor yaitu MyD88-dependent. Proses signaling melalui MyD88 melibatkan aktivasi awal dari NF- κ B dimana akan memicu produksi sitokin proinflamasi. Sedangkan terbentuknya signal jalur TLR dengan MyD88-independent yang akan melibatkan aktivasi fase lambat NF- κ B dan aktivasi IFN factor regulasi 3 sehingga memicu produksi IFN tipe 1 (IFN α/β), dan regulator respon imun. Aktivasi sinyal TLR4 juga diketahui dapat menghambat apoptosis sel tumor, sehingga hambatan pada aktivasi sinyal TLR4 pada sel kanker dapat mengurangi pertumbuhan dari tumor (Wang, et al., 2010).

Ada dua jalur apoptosis yakni dimediasi jalur mitokondria (jalur intrinsik) dan dimediasi reseptor (jalur ekstrinsik). Aktivasi apoptosis melalui jalur ekstrinsik melibatkan receptor cell death yang memicu caspase 8 terprogram. Aktivasi apoptosis dari jalur intrinsik adalah aktivasi apoptosis yang melalui depolarisasi mitokondrial, yang nantinya akan menginduksi cytochrome C (Zhang *et al.*, 2011). Jalur ekstrinsik diaktifkan melalui pengikatan *death ligand* dengan reseptor (misalnya Fas mengikat reseptor Fas), yang menyebabkan reseptor bergerak dan merekrut protein adaptor *Fas-associated protein with death domain* (FADD), diikuti dengan perekrutan inisiator procaspase-8 atau -10. Kompleks protein ini disebut sebagai *death-inducing signaling complex* (DISC). Pada sel tipe I aktivasi caspase-8 di DISC langsung mengaktifkan efektor caspase-3 , sehingga terjadi

apoptosis. Namun, pada sel tipe II, diaktifkan caspase-8 tidak langsung mengaktifkan efektor caspase-3 untuk terjadinya apoptosis (Shelton *et al.*, 2010).

Apoptosis dimediasi mitokondria diaktifkan melalui paparan stres sitotoksik, termasuk kerusakan DNA, faktor pertumbuhan, dan radiasi. Selama apoptosis jalur intrinsik, aktivasi caspase terutama diatur oleh kelompok protein Bcl-2. Kelompok protein Bcl-2 mengandung proapoptosis dan antiapoptosis yang berfungsi untuk mendukung atau menghambat permeabilisasi membran luar mitokondria (MOMP). MOMP menyebabkan pelepasan sitokrom c dari ruang antar mitokondria ke sitosol yang diperlukan untuk aktivasi caspase. Secara khusus, sitosol sitokrom c berinteraksi dengan Apaf-1 dan dATP untuk membentuk kompleks apoptosome, yang kemudian merekrut dan mengaktifkan inisiator caspase-9. Inisiator caspase-9 yang diaktivasi memotong dan mengaktifkan caspases efektor hilir, yang kemudian membelah berbagai sasaran substrat, sehingga terjadi apoptosis (Shelton *et al.*, 2010).

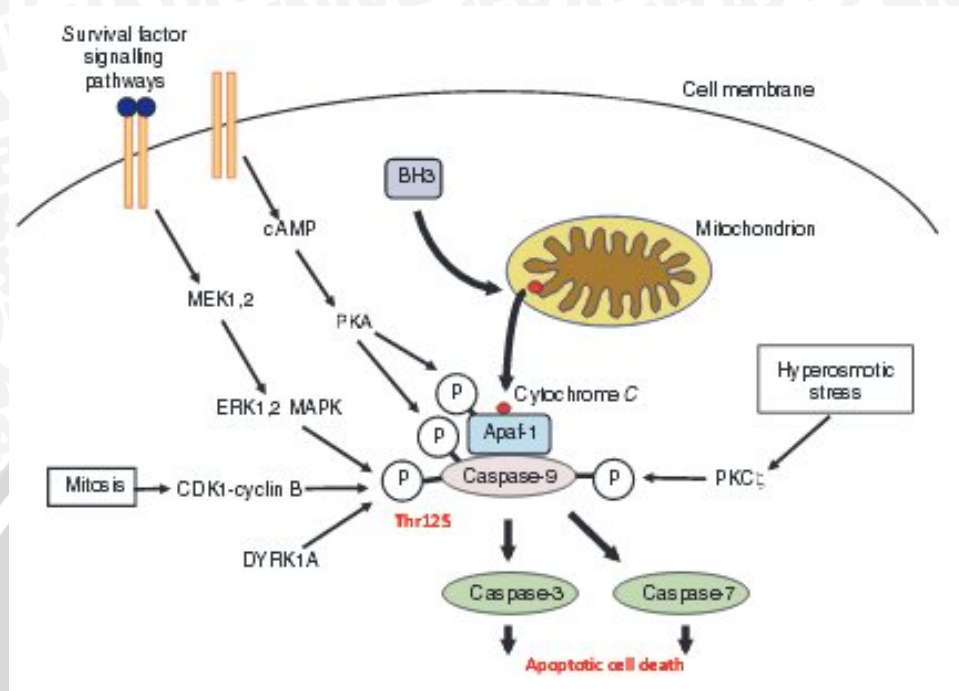
2.4 Cystein Aspartic Protease-9 (Caspase-9)

Caspase merupakan mediator penting dari kematian sel terprogram (apoptosis). Caspase adalah golongan aspartat- protease sistein spesifik untuk sinyal apoptosis. Caspase dibagi dalam 2 kelompok. Caspase-1, -4 dan -5 termasuk dalam kelompok I, caspase yang terlibat dalam pematangan sitokin. Apoptosis juga dikendalikan oleh caspase, kelompok II yang dibagi menjadi dua kelas, yaitu caspase inisiator (apikal) (caspase-2, -8, -9 dan -10) dan caspase efektor (caspase -3, -6 dan 7) (Ollson dan B Zhivotovsky, 2011). Dalam jalur

mitokondria, sitokrom-c mengaktivasi caspase-9 yang kemudian akan mengaktivasi caspase-3 sehingga terjadinya apoptosis (Wu,et al., 2010).

Caspase yang belum aktif dinamakan procaspase. Procaspase-9 merupakan caspase -9 yang belum aktif. Caspase-9 adalah caspase inisiator pada apoptosis jalur intrinsik atau jalur mitokondria. Banyak sinyal pro-apoptosis melalui jalur ini, yang merangsang pelepasan sitokrom c dari mitokondria. Dalam sitosol, sitokrom c mempromosikan oligomerisasi dari *apoptotic peptide seactivating factor* 1 (Apaf1), yang mengarah ke perekrutan dan aktivasi caspase-9 di apoptosome. Setelah diaktifkan, caspase-9 memotong dan mengaktivasi caspase efektor 3 dan 7, yang menargetkan regulasi dan struktural protein untuk proteolisis yang mempengaruhi kematian sel (Allan dan Paul, 2009).

Pelepasan sitokrom c dari mitokondria secara ketat dikontrol oleh limfoma sel B 2 (Bcl-2) yang merupakan protein yang mengontrol permeabilisasi dari membran mitokondria luar. Aktivitas enzimatik caspase - 9 dihambat langsung oleh *X-linked inhibitor of apoptosis* (XIAP). Caspase - 9 pada manusia pertama kali dilaporkan terfosforilasi pada tahun 1998, dan telah terbukti menjadi sasaran beberapa protein kinase yang merespon sinyal ekstraseluler, stres seluler selama siklus sel (Allan dan Paul, 2009).



Gambar 2.4 Regulasi Caspase 9 (Allan dan Paul, 2009).

2.5 Daun Kelor (*Moringa oleifera*)

2.5.1 Klasifikasi Daun Kelor

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
kelas	: Magnoliopsida
Order	: Viales
Family	: Moringaceae
Genus	: Moringa
Species	: <i>Oleifera</i> (Paliwal <i>et al.</i> , 2011).



Gambar 2.5 Daun kelor (Price, 2007)

2.5.2 Morfologi dan Persebaran Daun Kelor

Moringa oleifera merupakan tanaman asli dari Himalaya, India, Pakistan, sebagian kecil Asia, Afrika dan Arabia dan sekarang didistribusikan di Filipina, Kamboja, Amerika tengah, Amerika Utara dan Selatan dan pulau Karibia (Anwar *et al.*, 2006). Pohon Kelor dapat tumbuh dengan baik di lahan tropis yang kering atau panas lembab dengan tinggi rata-rata berkisar 5-10 m. Kelor dapat bertahan dalam kondisi iklim yang ekstrim, mudah tumbuh pada tanah yang kering dan gersang, dapat mentolerir curah hujan 250 mm dan maksimum pada lebih dari 3000 mm dan pH 5.0- 9.0. Batangnya lunak ,bercabang, kulit bergetah. Bunganya berwarna putih (Farooq *et al.*, 2012).

2.5.3 Kandungan dan Manfaat Daun Kelor

Daun *M. oleifera* kaya akan caretonoid, tacopherol dan vitamin A, C, E (Shahriar *et al.*, 2012), protein, kalsium, potasium, flavonoid, fenolic, β -carotene, tanin, saponin, alkaloid, glikosida, karbohidrat, triterpenoid (Anwar *et al.*, 2006). Daun kelor (*M. oleifera*) mengandung *thiocarbamates* seperti niamicin, *quercetin-3-O-glukoside* dan *kaempferol-3-O-glikoside* (Manguro and Lemmen, 2007), Senyawa glikosida, glucosinolate serta beta-sitosterol, (Berkovic *et al.*, 2013), *benzyl isothiocyanate* (Fahey, 2005).

Tabel 2.3 Nilai nutrisi daun kelor (*M. oleifera*) per 100 mg (Price, 2007):

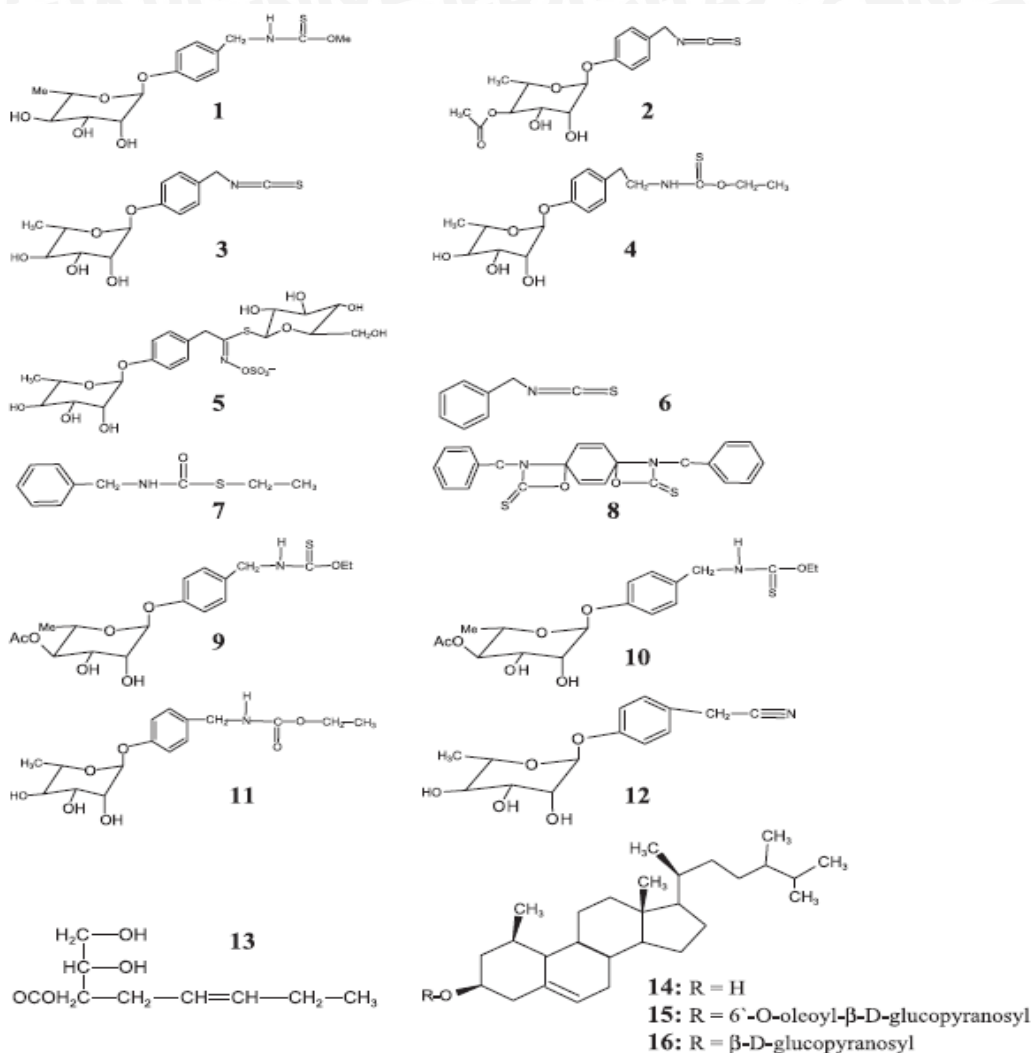
Component analyzed	Pods	Leaves	Leaf Powder
Moisture (%)	86.9	75.0	7.5
Calories	26	92	205
Protein (g)	2.5	6.7	27.1
Fat (g)	0.1	1.7	2.3
Carbohydrate (g)	3.7	13.4	38.2
Fiber (g)	4.8	0.9	19.2
Minerals (g)	2.0	2.3	-
Ca (mg)	30	440	2,003
Mg (mg)	24	24	368
P (mg)	110	70	204
K (mg)	259	259	1,324
Cu (mg)	3.1	1.1	0.57
Fe (mg)	5.3	7	28.2
S (mg)	137	137	870
Oxalic acid (mg)	10	101	1600
Vitamin A - B carotene (mg)**	0.11	6.8	16.3
Vitamin B -choline (mg)	423	423	-
Vitamin B1 -thiamin (mg)	0.05	0.21	2.64
Vitamin B2 -riboflavin (mg)	0.07	0.05	20.5
Vitamin B3 -nicotinic acid (mg)	0.2	0.8	8.2
Vitamin C -ascorbic acid (mg)	120	220	17.3
Vitamin E -tocopherol acetate (mg)	-	-	113
Arginine (mg)	90	402	1325
Histidine (mg)	27.5	141	613
Lysine (mg)	37.5	288	1325
Tryptophan (mg)	20	127	425
Phenylalanine (mg)	108	429	1388
Methionine (mg)	35	134	350
Threonine (mg)	98	328	1188
Leucine (mg)	163	623	1950
Isoleucine (mg)	110	422	825
Valine (mg)	135	476	1063

Daun *M. oleifera* dapat dikonsumsi dalam bentuk segar, dimasak ataupun disimpan sebagai serbuk kering selama beberapa bulan tanpa kehilangan banyak nutrisinya (Shahriar *et al.*, 2012). Di Thailand, buah dan daun *M.oleifera* telah dikonsumsi sebagai sayuran lebih dari 100 tahun (Budda *et al.*, 2011). Daun yang kaya akan nutrisi digunakan pada ibu hamil dan ibu menyusui dalam bentuk serbuknya untuk meningkatkan nutrisi anak, khususnya di daerah yang banyak menderita malnutrisi. Studi epidemiologi mengindikasikan bahwa daun *M. oleifera* dapat berfungsi sebagai anti tumor, anti inflamasi, anti ulcer, anti

arteriosklerosis dan anti konvulsan (Shahriar *et al.*, 2012). Selain itu juga digunakan untuk mengobati sakit kepala, ambeien, demam, sakit tenggorokan, bronkitis, infeksi mata dan telinga, kudisan, radang selaput lendir di hidung dan tenggorokan dan juga sebagai pencahar (Anwar *et al.*, 2006).

Ekstrak daun *M. oleifera* ditemukan efektif dalam memeriksa pertumbuhan jamur *Basidiobolus haptosporus* dan *ranarum Basidiobolus*. Daun *M. oleifera* secara signifikan menurunkan kadar glukosa darah pada tikus Wistar dan tikus Goto-Kakizaki (GK), model diabetes tipe 2. Studi lain menunjukkan bahwa ekstrak dari daun kelor efektif dalam menurunkan kadar gula darah dalam waktu 3 jam setelah konsumsi dan polifenol yang berperan dalam aktivitas hipoglikemik (Farooq *et al.*, 2012).

M. oleifera juga kaya akan antioksidan, ekstrak metanol dan etanol *M. oleifera* asal India memiliki antioksidan tertinggi yakni masing-masing 65,1% dan 66,8%. Dilaporkan bahwa senyawa bioaktif utama fenolat, seperti quercetin dan kaempferol yang berperan dalam aktivitas antioksidan. Ekstrak etanol daun kelor menunjukkan perlindungan yang signifikan terhadap kerusakan hati yang disebabkan oleh obat antitubercular [isoniazid (INH), rifampisin (RMP), dan pirazinamid (PZA)] pada tikus (Farooq *et al.*, 2012).



Gambar 2.6 senyawa dan struktur kimia yang terkandung dalam *Moringa oleifera*. niazinin A [1], 4-(4'-O-acetyl-α-L-rhamnopyranosyloxy) benzil isotiosianat[2], 4-(-L-rhamnopyranosyloxy)benzil isotiosianat[3], niazimisin [4], 4-(α-L-rhamnopyranosyloxy)benzil glucosinolate [5], benzil isothiocyanate [6], aglycon of deoxy-niazimicine (N-benzil, S-etiltioformat) [7], pterigospermin [8], niaziminin [9 + 10], O-etil-4-(α-L-ramnosiloksi) benzil karbamat[11], niazirin [12], gliserol-1-(9-oktadekanoat) [13], β-sitosterol [14], 3-O-(6'-O oleoyl-β-D-glukopiranosil)-β-sitosterol [15], β-sitosterol-3-O-β-D glukopiranosid[16] (Anwar et al., 2006).

2.5.4 Daun Kelor sebagai Agen Terapi Kanker

Caspase merupakan mediator penting dari kematian sel terprogram (apoptosis). Dalam jalur mitokondria, sitokrom-c mengaktivasi caspase-9 yang kemudian akan mengaktivasi caspase-3 sehingga apoptosis (Wu, *et al.*, 2010). Beberapa golongan flavonoid yaitu kaempferol dan quercetin merupakan antioksidan yang banyak terdapat di daun kelor yang secara tidak langsung meningkatkan aktivitas dari caspase 9.

Manguro and Lemmen (2007) mengatakan ada flavanoid glikosida yang terkandung dalam ekstrak daun kelor. Kandungan spesifik ekstrak daun kelor berperan sebagai anti kanker yaitu *4-(α -L-rhamnopyranosyloxy) benzyl glucosinolate*, *4-(α -L-rhamnopyranosyloxy) benzyl isothiocyanate* dan niazimicin. *Quercetin-3-O-glukoside* dan *kaempferol-3-O-glikoside* sebagai antioksidan untuk melawan radikal bebas dan *thiocarbamates* seperti niamicin adalah agen kemopreventif. Flavonoid dapat menghambat pertumbuhan sel dan apoptosis sel kanker. Pada daun kelor terdapat senyawa glikosida, glucosinolate serta beta-sitosterol, yang menunjukkan adanya sifat anti-kanker (Berkovic *et al.*, 2013).

Daun kelor juga mengandung *benzyl isothiocyanate* (Fahey, 2005) yang diketahui dapat menginduksi apoptosis pada sel kanker. Induksi *benzyl isothiocyanat* pada fosforilasi Bcl-2 pada fase G2-M dapat memisahkan interaksi antara Bcl-2 dan Bax yang mengakibatkan induksi apoptosis yang dipicu oleh sinyal apoptosis pada jalur mitokondria. *Benzyl isothiocyanate* menginduksi apoptosis pada sel epitel hati tikus tergantung pada aktivasi apoptosis pada jalur mitokondria yang mengaktifkan caspase-9 dan caspase-3 (Miyoshi *et al.*, 2004). Kaempferol pada daun kelor berfungsi sebagai antiproliferasi pada sel MCF 7 dan juga menginduksi apoptosis (Sreelatha *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2006).

Penelitian Granado-Serrano *et al.* (2006) menyelidiki pengaruh quercetin pada aktivasi jalur apoptosis pada sel hepatoma manusia (HepG2). Dari hasil penelitian, caspase 9 teraktivasi setelah inkubasi 18 jam dengan $25\mu\text{ mol/L}$ quercetin dan semakin meningkat pada konsentrasi $25\text{--}75\mu\text{ mol/L}$. Selain itu, flavonoid menurunkan rasio Bcl-xL:Bcl-xS dan meningkatkan translokasi Bax ke membrane mitokondria. Data ini menunjukkan bahwa quercetin dapat menginduksi apoptosis dengan aktivasi langsung caspase kaskade (jalur mitokondria) dan dengan menghambat kelangsungan hidup sinyal di HepG2.

Quercetin memiliki efek antiproliferative dan dapat menginduksi kematian sel melalui mekanisme apoptosis pada *cell line* payudara, paru, hepatoma, oral, kolon dan leukemia. Beberapa studi lain juga membuktikan bahwa quercetin mengindikasikan aktivasi jalur mitokondria dan caspase 9 pada sel kanker kolon dan leukimia. Quercetin mengaktivasi caspase-3, caspase-9 dan pelepasan sitokrom c pada sel leukimia HL-60, memblok siklus sel G1 pada sel kanker lambung, nasopharingeal, endometrial dan hepatic, dan juga memproduksi fragmentasi DNA pada sel hepatocarcinoma, leukemia dan thymocyte tikus. Quercetin juga menghambat protein anti-apoptosis dari kelompok Bcl-2 yakni Bcl-xL dan Bcl-2, dan mengaktivasi pro-apoptosis seperti Bax dan Bad (Granado-Serrano *et al.*, 2006).

Banyak penelitian yang membuktikan daun kelor untuk terapi kanker. Ekstrak daun kelor menghambat pertumbuhan sel kanker pankreas dan juga meningkatkan efikasi kemoterapi pada sel kanker pankreas (Berkovich *et al.*, 2013). Ekstrak etanol daun kelor meningkatkan efek sitotoksik doxorubicin pada sel kanker servik (Hermawan *et al.*, 2012), mempunyai efek sitotoksik pada kanker paru, kanker prostat (Saetung *et al.*, 2005), dan kanker kolon (Pamok *et*

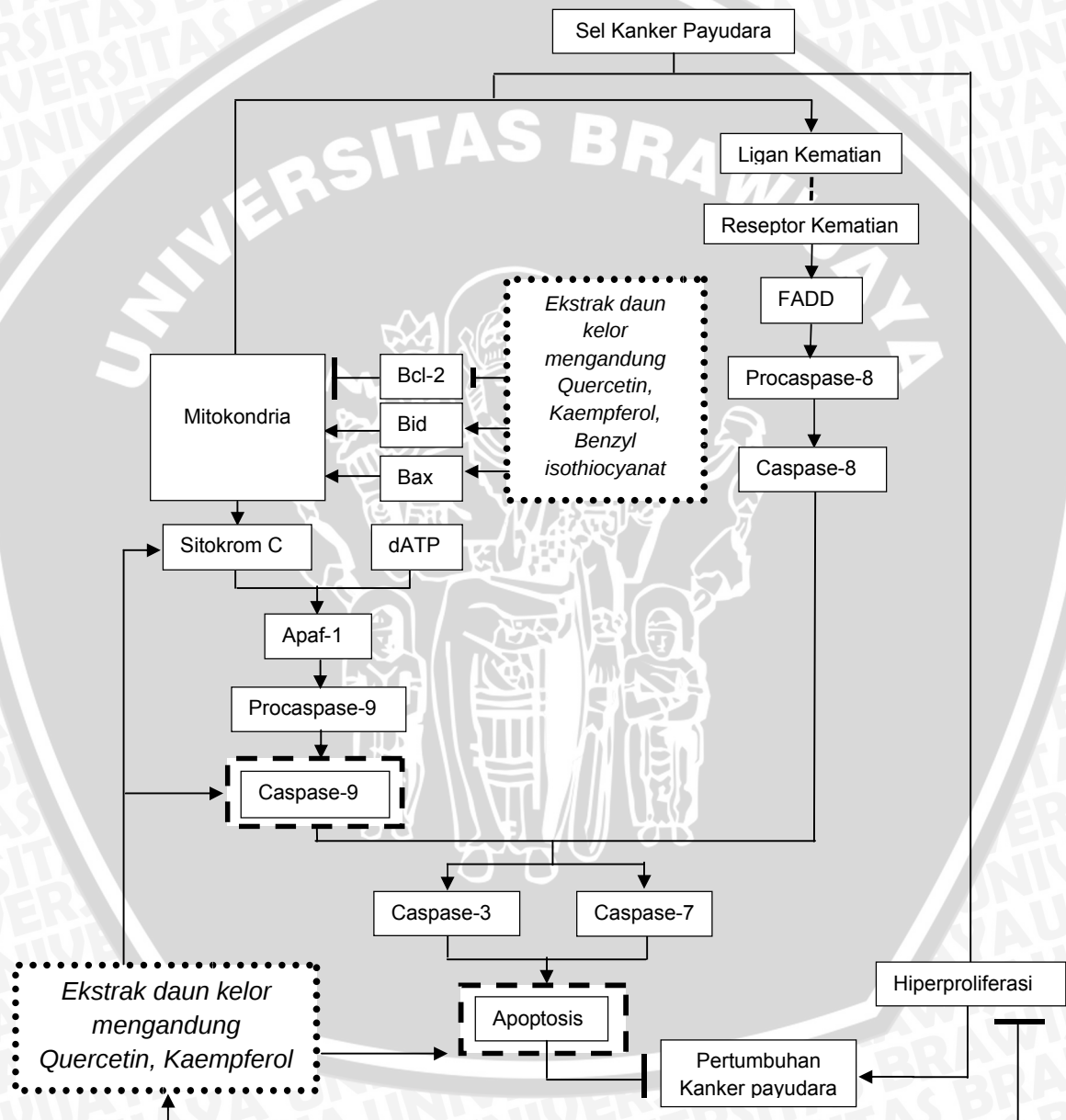
al., 2012). Inhibition concentration 50% (IC₅₀) ekstrak etanol daun kelor (*M. oleifera*) sebagai antioksidan adalah 62,09 µg/ml (Shahriar, 2012). Pada kanker kolon IC₅₀ ekstrak daun kelor pada *cell line* SW48, SW480, HCT masing-masing 102,40 µg/ml, 197,20 µg/ml, 264,83 µg/ml (Pamok *et al.*, 2012). Pada kanker prostat (PC3) IC₅₀ 105,47µg/ml dan kanker paru (CORL-23) IC₅₀ 98,09 µg/ml (Saetung *et al.*, 2005). Sedangkan ekstrak etanol pada sel Hela IC₅₀ > 250 µg/ml (Hermawan *et al.*, 2012).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Bagan 3.1 Kerangka Konsep

Keterangan:

- = Yang diteliti
- = Menghambat
- = Mengaktivasi
- = Berikatan
- = Perlakuan

Saat terjadi kanker, diperlukan aktivasi proses apoptosis. Apoptosis dapat terjadi melalui jalur intrinsik ataupun jalur ekstrinsik. Pada jalur intrinsik, mitokondria melepaskan sitokrom c yang akan mengaktivasi caspase-9 (Wu, et al., 2010). Banyak sinyal pro-apoptosis melalui jalur ini, yang merangsang pelepasan sitokrom c dari mitokondria. Dalam sitosol, sitokrom c mempromosikan oligomerisasi dari Apaf-1, yang mengarah ke perekrutan dan aktivasi caspase-9 di apoptosome. Setelah diaktifkan, caspase-9 memotong dan mengaktivasi caspase efektor yakni caspase-3 dan caspase-7 sehingga apoptosis (Allan dan Paul, 2009). Pada jalur ekstrinsik, ligan kematian seperti TNF α , TRAIL, FasL berikatan dengan reseptor kematian masing-masing TNF-R, DR4/DR5, dan FAS, akibatnya terbentuk kompleks, FADD, yang memicu aktivasi caspase-8, yang selanjutnya caspase-8 akan mengaktivasi caspase-3 dan caspase-7 sehingga terjadi apoptosis.

Daun kelor banyak memiliki senyawa kimia yang dapat menginduksi terjadinya apoptosis pada sel kanker seperti quercetin, kaempferol dan *benzyl isothiocyanat*. Quercetin mengaktivasi jalur mitokondria, pelepasan sitokrom c, aktivasi caspase 9, menghambat protein anti-apoptosis Bcl-2 dan mengaktivasi pro-apoptosis seperti Bax dan Bad (Granado-Serrano et al., 2006). *Benzyl isothiocyanate* menginduksi apoptosis, mengaktifkan caspase-9 (Miyoshi et al., 2004). Selain itu, Manguro dan Lemmen (2007) menyatakan bahwa kandungan kaempferol dan quercetin pada daun *M. oleifera* secara tidak langsung meningkatkan aktivitas dari caspase-9. Kaempferol pada daun kelor berfungsi sebagai antiproliferasi dan juga menginduksi apoptosis (Sreelatha et al., 2011).

3.2 Hipotesis Penelitian

- 3.2.1 Ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dapat meningkatkan ekspresi *cystein aspartat protease-9* (caspase-9) pada *cell-line* kanker payudara MCF-7.
- 3.2.2 Ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dapat meningkatkan apoptosis pada *cell-line* kanker payudara MCF-7.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan studi empiris melalui pendekatan kuantitatif dan kualitatif secara eksperimental murni menggunakan desain *experimental in vitro, post-test only, control group design* untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dalam meningkatkan ekspresi *cystein aspartat protease-9* (Caspase-9) dan menginduksi apoptosis sel MCF-7 dengan dosis yang efektif.

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian yang digunakan adalah sel MCF-7, *cell line* kanker payudara yang di kultur. Sel MCF-7 diperoleh dari *American Type Culture Collection* (ATCC) Yogyakarta. Dalam penelitian ini terdapat 4 macam pengujian yakni uji kualitatif ekstrak *M. oleifera*, uji penentuan IC_{50} dengan *MTT Assay*, uji ekspresi caspase-9 dengan imunositokimia dan uji apoptosis sel MCF-7 dengan *TUNEL Assay*.

Dosis yang digunakan pada percobaan dosis ke-1 sebanyak 22 dosis ekstrak yakni seri dosis 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125 $\mu\text{g/ml}$ dan dosis kelipatan 50 yakni 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, dan 700 $\mu\text{g/ml}$. Sedangkan percobaan MTT 2 melanjutkan dosis pertama dengan rentang yang lebih besar. Dosis yang digunakan sebanyak 30 dosis yang terdiri dari seri dosis 20.000, 10.000, 5000, 2500, 1250 $\mu\text{g/ml}$ dan

dosis kelipatan 200 yang terdiri dari 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2200, 2400, 2600, 2800, 3000, 3200, 3400, 3600, 3800, 4000, 4200, 4400, 4600, 4800, 5200, 5400, 5600, 5800, 6000 dan 6200 µg/ml. Waktu inkubasi yang digunakan adalah 24 jam untuk pengujian MTT dan juga terdapat kontrol negatif berupa sel MCF-7 tanpa diberi ekstrak.

Untuk uji ekspresi caspase-9 dan uji apoptosis menggunakan dosis IC₅₀ yang didapat melalui MTT, dosis yang digunakan yakni dosis IC₅₀, ½ dari IC₅₀ dan 2x IC₅₀ dan juga kontrol (tanpa antibodi primer). Jumlah pengulangan untuk masing-masing perlakuan dapat dicari dengan menggunakan rumus Federer yakni $(t-1)(n-1) \geq 15$, dengan n = jumlah pengulangan tiap perlakuan dan t = jumlah perlakuan.

4.2.1 Dosis yang Digunakan dalam Penentuan IC₅₀

Perhitungan pengulangan MTT 1 (Nazir, 2004):

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(22-1)(n-1) \geq 15$$

$$21(n-1) \geq 15$$

$$21n \geq 15 + 21$$

$$n \geq 1,71$$

keterangan :

t : Jumlah Perlakuan

n : jumlah pengulangan

Pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini harus lebih dari 1,71 sehingga dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali. Pembagian kelompok perlakuan MTT 1 dapat dilihat pada Tabel 4.1

Tabel 4.1 Pembagian Kelompok Perlakuan MTT 1

No	Kelompok	Perlakuan	Konsentrasi Ekstrak Daun Kelor
1	Kontrol negatif	Sel MCF-7 + DMEM	-
2	Kontrol media	hanya berisi DMEM	-
3	I	Sel MCF-7 + DMEM	1000 µg/ml
4	II		500 µg/ml
5	III		250 µg/ml
6	IV		125 µg/ml
7	V		62,5 µg/ml
8	VI		31,25 µg/ml
9	VII		15,625 µg/ml
10	VIII		7,8125 µg/ml
11	IX		700 µg/ml
12	X		650 µg/ml
13	XI		600 µg/ml
14	XII		550 µg/ml
15	XIII		500 µg/ml
16	XIV		450 µg/ml
17	XV		400 µg/ml
18	XVI		350 µg/ml
19	XVII		300 µg/ml
20	XVIII		250 µg/ml
21	XIX		200 µg/ml
22	XX		150 µg/ml
23	XXI		100 µg/ml
24	XXII		50 µg/ml

Perhitungan pengulangan MTT 2 (Nazir, 2004):

$$(t-1) (n-1) \geq 15$$

$$(30-1) (n-1) \geq 15$$

$$29 (n-1) \geq 15$$

$$29n \geq 15 + 29$$

$$n \geq 1,52$$

keterangan :

t : Jumlah Perlakuan

n : jumlah pengulangan

Pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini harus lebih dari 1,52 sehingga dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Pembagian kelompok perlakuan MTT 2 dapat dilihat pada Tabel 4.2

Tabel 4.2 Pembagian Kelompok Perlakuan MTT 2

No	Kelompok	Perlakuan	Konsentrasi Ekstrak Daun Kelor
1	Kontrol negatif	Sel MCF-7 + DMEM	-
2	Kontrol media	hanya berisi DMEM	-
3	I	Sel MCF-7 + DMEM	20000 µg/ml
4	II		10000 µg/ml
5	III		5000 µg/ml
6	IV		2500 µg/ml
7	V		1250 µg/ml
8	VI		6200 µg/ml
9	VII		6000 µg/ml
10	VIII		5800 µg/ml
11	IX		5600 µg/ml
12	X		5400 µg/ml
13	XI		5200 µg/ml
14	XII		4800 µg/ml
15	XIII		4600 µg/ml
16	XIV		4400 µg/ml
17	XV		4200 µg/ml
18	XVI		4000 µg/ml
19	XVII		3800 µg/ml
20	XVIII		3600 µg/ml
21	XIX		3400 µg/ml
22	XX		3200 µg/ml
23	XXI		3000 µg/ml
24	XXII		2800 µg/ml
25	XXIII		2600 µg/ml
26	XXIV		2400 µg/ml
27	XXV		2200 µg/ml
28	XXVI		2000 µg/ml
29	XXVII		1800 µg/ml
30	XXVIII		1600 µg/ml
31	XXIX		1400 µg/ml
32	XXX		1200 µg/ml

4.2.2 Dosis yang Digunakan dalam Uji Ekspresi Caspase-9 dan Apoptosis

Perhitungan pengulangan Imunositokimia Caspase-9 dan TUNEL Assay (Nazir, 2004):

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

$$3n \geq 15 + 3$$

$$n \geq 6$$

keterangan :

t : Jumlah Perlakuan

n : jumlah pengulangan

Pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebanyak 6 kali. Pembagian kelompok perlakuan Imunositokimia caspase-9 dapat dilihat pada Tabel 4.3 dan Pembagian kelompok perlakuan apoptosis dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.3 Pembagian Kelompok Perlakuan Imunositokimia Caspase-9

No	Kelompok	Perlakuan / Konsentrasi
1	Kontrol tanpa antibodi	tanpa pemberian ekstrak daun kelor dan tanpa antibodi caspase-9
2	Kontrol perlakuan	tanpa pemberian ekstrak daun kelor
3	I	1100 µg/ml (1/2x IC ₅₀)
4	II	2200 µg/ml (IC ₅₀)
5	III	4400 µg/ml (2x IC ₅₀)

Tabel 4.4 Pembagian Kelompok Perlakuan Apoptosis

No	Kelompok	Perlakuan / Konsentrasi
1	Kontrol perlakuan	tanpa pemberian ekstrak daun kelor
2	I	1100 µg/ml (1/2x IC ₅₀)
3	II	2200 µg/ml (IC ₅₀)
4	III	4400 µg/ml (2x IC ₅₀)

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun kelor (*M. oleifera*).

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah ekspresi caspase-9 dan Apoptosis sel.

4.4 Definisi Istilah/Operasional

- 1) Daun Kelor (*M. oleifera*) yang digunakan berbentuk serbuk berwarna hijau yang diperoleh dari Balai Materia Medika Batu, Jawa Timur.
- 2) Ekstrak daun Kelor diperoleh dari serbuk daun kelor yang diekstraksi dengan maserasi menggunakan pelarut etanol 70 %
- 3) MCF-7 merupakan *cell line* kanker payudara yang diperoleh dari Laboratorium Pengujian dan Penelitian Terpadu (LPPT), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- 4) *Inhibiton Concentration* (IC_{50}) dilihat melalui *MTT* (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) Assay. Dosis yang mendekati IC_{50} dilakukan perhitungan menggunakan regresi linier hingga ditemukan IC_{50}
- 5) Ekspresi Caspase-9 diuji dengan metode imunositokimia dengan 5 perlakuan dan 6 kali pengulangan, masing-masing pengulangan terdapat foto mikroskopik sampel 10 lapang pandang. Sel yang terekspresikan caspase-9 berwarna coklat pada inti sel.

- 6) Apoptosis diuji dengan menggunakan metode *TUNEL Assay* dengan 4 perlakuan dan 6 kali pengulangan, masing-masing pengulangan terdapat foto mikroskopik sampel 10 lapang pandang. Sel yang apoptosis berwarna coklat pada inti sel.
- 7) Indeks ekspresi caspase-9 adalah persentase perbandingan total sel yang terekspresi dan total seluruh sel dari 10 lapang pandang
- 8) Indeks apoptosis adalah persentase perbandingan total sel yang apoptosis dan total seluruh sel dari 10 lapang pandang

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan bulan Februari – Juni 2014. Ekstraksi dilakukan di laboratorium Bahan Alam, Program Studi Farmasi, Universitas Brawijaya. Pengeringan ekstrak dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya. Kultur sel MCF-7 dan *MTT Assay* dilakukan di Laboratorium Pengujian dan Penelitian Terpadu (LPPT), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, dan uji ekspresi caspase-9 dan apoptosis dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Foto hasil imunositokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan Ekstraksi

Serbuk daun kelor (*M. oleifera*) diperoleh dari Balai Materia Medika (BMM) Batu. Bahan lain yang digunakan adalah etanol 70% yang didapatkan dari Laboratorium Bahan Alam, Program Studi Farmasi Universitas Brawijaya.

Alat yang digunakan untuk ekstraksi adalah wadah maserat, *rotary evaporator*, botol kaca, kain flannel sebagai penyaring, bejana *stainless steel*, aluminium foil, timbangan digital, spatel, stirer, cawan porselen, gelas ukur.

4.6.2 Alat dan Bahan Penentuan Kualitatif Ekstrak

4.6.2.1 Flavonoid

Bahan yang digunakan dalam uji flavonoid adalah ekstrak daun kelor, HCL p.a, serbuk magnesium, air suling, butanol. Alat yang digunakan adalah plat tetes dan pipet tetes.

4.6.2.2 Saponin

Bahan yang digunakan dalam uji saponin adalah ekstrak daun kelor, aquades. Alat yang digunakan adalah tabung reaksi dan pipet tetes.

4.6.2.3 Alkaloid

Bahan yang digunakan dalam uji alkaloid adalah ekstrak daun kelor, HCL 2N, NaCl, HCl, pereaksi mayer. Alat yang digunakan adalah tabung reaksi, plat tetes dan pipet tetes.

4.6.2.4 Tanin

Bahan yang digunakan dalam uji tanin adalah ekstrak daun kelor, FeCl_3 . Alat yang digunakan adalah plat tetes dan pipet tetes.

4.6.2.5 Terpenoid

Bahan yang digunakan dalam uji terpenoid adalah ekstrak daun kelor, CHCl_3 dan H_2SO_4 . Alat yang digunakan adalah plat tetes dan pipet tetes.

4.6.2.6 Fenol

Bahan yang digunakan dalam uji fenol adalah ekstrak daun kelor, FeCl_3 . Alat yang digunakan adalah plat tetes dan pipet tetes.

4.6.3 Alat dan Bahan Kultur Sel MCF-7

Bahan yang digunakan dalam kultur sel adalah sel MCF-7, medium DMEM, penicillin-streptomycin, FBS (*Fetal Bovine Serum*), PBS (*Phosphate Buffer Saline*), Sodium Bicarbonate, HCl, Trypsine-EDTA, aquadest, spirtus, dan alkohol. Alat yang digunakan dalam kultur sel adalah laminar air-flow, inkubator $37^\circ\text{C} \pm 5\% \text{ CO}_2$, mikroskop *inverted*, 96-wellplates, cover glass, sentrifuge, mikro pipet, syringe, Filter 0.2 μm , *blue tip*, *yellow tip* dan tisu.

4.6.4 Alat dan Bahan Pemaparan Ekstrak pada Kultur Sel

Bahan yang digunakan pada pemaparan ekstrak pada kultur sel adalah ekstrak daun kelor, DMSO. Alat yang digunakan adalah well plate, mikropipet, microtube.

4.6.5 Alat dan Bahan Penentuan IC_{50}

Bahan yang digunakan untuk uji proliferasi adalah sel MCF 7, ekstrak daun kelor, DMSO (Dimethyl Sulfoxide), DMEM, PBS 1X, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide), dan stopper SDS 10% dalam 0.1 N HCl. Alat yang digunakan untuk uji proliferasi adalah Mikropipet, tabung reaksi kecil, rak tabung kecil, vortex, *conical tube*, 96-well plate, ELISA-reader atau microplate reader, tempat buangan untuk media bekas dan PBS, tisu, *blue tip*, *yellow tip* dan aluminium foil.

4.6.6 Alat dan Bahan Uji Ekspresi Caspase-9

Bahan yang digunakan untuk imunositokimia adalah sel MCF 7, DMSO (Dimethyl Sulfoxide), DMEM, PBS 1X, metanol, larutan hidrogen peroksida (*blocking solution*), *prediluted blocking serum*, antibodi sekunder yang dilabel biotin (*biotinylated universal secondary antibody*), substrat kromogen DAB, streptavidin-enzim peroksidase, Mayer Haematoxylin, antibodi monoklonal primer untuk caspase-9, xylol, dan entelan. Alat yang digunakan adalah inkubator, Mikropipet 20, 200, 1000 μ L, tabung reaksi kecil, rak tabung kecil, vortex, *cover slip*, *object glass*, *24-well plate*, *blue tip*, *yellow tip*, *tissue* dan buangan untuk media bekas.

4.6.7 Alat dan Bahan Uji Apoptosis

Bahan yang digunakan untuk *TUNEL* assay adalah sel MCF 7, Xylene, 100%, etanol 95 % dan etanol 70%, aquadest steril, *fixation solution*, *blocking solution*, *permeabilisation solution*, *TUNEL Reaction Mixture*, *converter POD*, substrat DAB, PBS (Phosphate Buffer Saline), mayer dan aquades. Alat yang digunakan untuk *TUNEL* assay adalah *cover slide*, *object glass*, *24-well plate*, *blue tip*, *yellow tip*, dan buangan untuk media bekas, inkubator, mikroskop, vortex, oven.

4.7 Prosedur penelitian

4.7.1 Ekstraksi Daun Kelor (*M. oleifera*) dengan Maserasi

100 gram serbuk daun kelor (*Moringa oleifera*) yang sudah ditimbang dilarutkan dalam 1 L etanol 70% dengan menggunakan *stirrer* dengan kecepatan 500 g selama 30 menit. Larutan didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang

dalam keadaan tertutup. Kemudian dilakukan remaserasi. Larutan yang sudah didiamkan 24 jam disaring dengan menggunakan kain saring sedikit demi sedikit. Larutan disaring sebanyak 2 kali. Hasil filtrat dipisahkan dengan maseratnya pada toples yang berbeda. Maserat kemudian dilarutkan dengan etanol 70% sebanyak 1 L dengan menggunakan *stirrer* dengan kecepatan 500 g selama 30 menit. Setelah itu larutan didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang dalam keadaan tertutup. Remaserasi dilakukan sebanyak 2 kali. Selanjutnya, dilakukan pemisahan ekstrak dengan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* selama 3 hari pada suhu 40°C dengan kecepatan rotary 70 g. Ekstrak kemudian dikeringkan dengan menggunakan *vacuum oven* dengan suhu *vacuum oven* 40°C dan suhu *safety vacuum oven* 80°C. Pengerangan selesai dilakukan jika didapatkan berat ekstrak yang konstan.

4.7.2 Penentuan Kualitatif Fitokimia Daun Kelor (*M. oleifera*)

4.7.2.1 Flavonoid

Ekstrak dilarutkan dalam aquades dengan perbandingan 1 : 1, 1 ml sampel diambil dengan menggunakan gelas ukur, ditambahkan 5% NaOH sebanyak 5 tetes, diamati warna yang terbentuk, kemudian ditambahkan 2M HCl, sampel mengandung flavonoid jika warna kuning tidak lebih pekat dari sebelumnya.

4.7.2.2 Saponin

Ekstrak dilarutkan dalam aquades dengan perbandingan 1 : 1,2 ml sampel diambil dengan menggunakan gelas ukur, ditambahkan 2 ml aquades, dikocok selama 15 menit, diamati sampel, mengandung saponin jika terbentuk lapisan busa yang stabil (tidak mudah hilang).

4.7.2.3 Alkaloid

125 mg sampel ditimbang, dilarutkan dalam HCl sebanyak 5 ml, disaring dengan menggunakan kertas saring, diambil filtratnya sebanyak 2 ml, ditambahkan 2 – 3 tetes reagen dragendorf dengan menggunakan pipet tetes, diamati perubahan warna yang terbentuk, sampel berwarna kecokelatan jika mengandung alkaloid.

4.7.2.4 Tanin

10 mg sampel ditimbang dengan menggunakan gelas arloji, dilarutkan dalam 15 mL aquades pada tabung reaksi, ditambahkan 3 tetes FeCl_3 , diamati warna yang terbentuk, sampel mengandung tanin jika berwarna coklat kehijauan sampai biru kehitaman.

4.7.2.5 Terpenoid

Ekstrak dilarutkan dalam aquades dengan perbandingan 1 : 1,5 mL larutan ekstrak diambil dengan menggunakan gelas ukur, ditambahkan kloroform sebanyak 2 ml, ditambahkan H_2SO_4 pekat sebanyak 3 ml, diamati warna yang terbentuk, sampel mengandung terpenoid jika berwarna coklat kemerahan.

4.7.2.6 Fenol

50 mg ekstrak ditimbang, dilarutkan dalam 5 ml aquades, ditambahkan 2-3 tetes larutan 5% FeCl_3 , diamati warna yang terbentuk, sampel mengandung fenol jika berwarna hijau gelap.

4.7.3 Kultur Sel MCF7

4.7.3.1 Penumbuhan sel

- 1) Disiapkan aliquot 3 mL DMEM dalam *conical tube* steril

- 2) Diambil ampul (*cryo tube*) yang berisi sel MCF-7 dari tangki nitrogen cair
- 3) Dicairkan suspensi sel dalam *cryo tube* pada suhu kamar hingga tepat mencair
- 4) Diambil suspensi sel dengan mikropipet 1 ml (blue tip), masukkan tetes demi tetes ke dalam DMEM yang telah disiapkan dalam *conical tube*
- 5) Ditutup *conical tube* dengan rapat. Sentrifugasi dengan sentrifus untuk *conical tube* (tanpa pendingin) pada 1000 rpm selama 5 menit sebanyak 2 kali
- 6) Disemprot *conical tube* dan tangan dengan alkohol 70 % yang dilakukan dalam *laminar air flow*
- 7) Dibuka *conical tube*, tuang supernatan DMEM ke dalam pembuangan
- 8) Ditambahkan 4 ml DMEM baru, resuspensikan kembali sel hingga homogen
- 9) Diletakan masing-masing 2 ml suspensi sel ke dalam 2 *cell culture dish*
- 10) Ditambahkan masing-masing 5 ml DMEM ke dalam dish, dihomogenkan dan diamati kondisi sel dengan mikroskop, pastikan sel homogen pada seluruh permukaan *dish*)
- 11) Diberi label dan simpan sel ke dalam inkubator inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$

4.7.3.2 Pergantian Media

- 1) Dicampur PBS dan DMEM di dalam *conical tube*
- 2) Dibuang media lama secara perlahan
- 3) Dituang 3 ml PBS ke dalam *dish*, goyang-goyangkan dish ke kanan dan ke kiri untuk mencuci sel
- 4) Dibuang PBS

- 5) Dituang 7 ml DMEM ke dalam *dish* yang berisi sel
- 6) Diamati kondisi dan jumlah sel secara kualitatif pada mikroskop *inverted*
- 7) Diinkubasi semalam dan amati keadaan sel keesokan harinya

4.7.3.3 Pemanenan Sel

- 1) Diambil sel dari inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%$ CO_2 diamati kondisi sel, panen sel dilakukan setelah sel 80% konfluen
- 2) Dibuang media lama
- 3) Dicuci sel 2 kali dengan PBS 1x (volume PBS adalah $\pm \frac{1}{2}$ volume media awal)
- 4) Ditambahkan tripsin-EDTA 1x (trypsin 0,25%) secara merata dan inkubasi di dalam inkubator selama 3 menit
- 5) Ditambahkan DMEM ± 5 mL untuk menginaktifkan tripsin, meresuspensi sel dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu
- 6) Diamati keadaan sel di mikroskop, resuspensi kembali jika masih ada sel yang menggerombol
- 7) Diletakkan sel yang telah lepas satu-satu ke dalam *conical* steril baru

4.7.3.4 Perhitungan Sel

- 1) Diambil sel dari inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%$ CO_2 , diamati kondisi sel
- 2) Dibuang media dengan menggunakan pipet pasteur steril
- 3) Dicuci sel 2 kali dengan PBS 1x (volume PBS + $\frac{1}{2}$ volume media awal)
- 4) Ditambahkan tripsin-EDTA 1x (trypsin 0,25%) secara merata dan inkubasi di dalam inkubator selama 3 menit

- 5) Ditambahkan media kurang lebih 2-3 ml untuk menginaktifkan tripsin, meresuspensi sel dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu
- 6) Diamati keadaan sel di mikroskop, meresuspensi kembali jika masih ada sel yang menggerombol
- 7) Diletakkan sel yang telah lepas satu-satu ke dalam *conical* steril baru, tambahkan DMEM kurang lebih 2-3 ml, resuspensi sel
- 8) Diambil 10 μ l panen sel dan dipipetkan ke hemasitometer
- 9) Dihitung sel di bawah mikroskop (*inverted* atau mikroskop cahaya) dengan *counter*

4.7.3.5 Subkultur Sel

- 1) Dilakukan panen sel sesuai dengan protokol panen sel
- 2) Diresuspensi suspensi sel di dalam *conical tube*
- 3) Diambil 300 μ l panen sel dan masukkan ke dalam *conical* yang lain. menambahkan 7 ml DMEM dan meresuspensi kembali
- 4) Dituang sel ke dalam wadah (dish) yang telah disiapkan, dihomogenkan dan diamati kondisi dan jumlah sel secara kualitatif
- 5) Diinkubasi semalam dan mengganti DMEM esok harinya, diamati keadaan sel sebelum dan setelah diganti media

4.7.4 Pemaparan Ekstrak Daun Kelor (*M. oleifera*) pada kultur sel MCF7

- 1) Diencerkan ekstrak daun kelor dengan DMSO sesuai konsentrasi yang digunakan untuk MTT 1, MTT2, Imunositokimia dan TUNEL Assay.
- 2) Ditambahkan larutan ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) ke dalam *well plate* yang telah berisi sel dan medium.

- 3) Diinkubasi selama 24 jam.
- 4) Dicuci larutan ekstrak daun kelor dengan medium sel DMEM

4.7.5 Uji penentuan IC₅₀ dengan MTT Assay

Pengujian menggunakan 96 *well-plate* dengan prosedur sebagai berikut,

- 1) Serbuk MTT sebanyak 5 mg ditambahkan dengan 1 ml PBS Qulified ke dalam falcon
- 2) Ditambahkan DMEM sebanyak 9 ml
- 3) diambil sebanyak 100 μ l dan ditambahkan kedalam masing-masing *well-plate*. Sebelum diterapkan, medium DMEM yang lama dalam *well-plate* yang berisi sel dibuang
- 4) Diinkubasi selama 4-6 jam pada suhu 37° C dengan kadar $\pm$ 5% CO₂
- 5) Ditambahkan stop solution dan diinkubasi selama 24 jam
- 6) Dibaca absorbansinya pada panjang gelombang (λ) 550 nm menggunakan *ELISA Reader*
- 7) Dihitung % hambatan proliferasi sel menggunakan rumus

Perhitungan persen hambatan proliferasi (Putra dkk, 2012):

$$\% \text{ hambatan proliferasi} = \frac{\text{Optical density kontrol sel} - \text{Optical density perlakuan}}{\text{Optical density kontrol sel}} \times 100$$

4.7.6 Uji Ekspresi Caspase-9 dengan Imunositokimia

Prosedur kerja imunositokimia Caspase-9 sebagai berikut:

- 1) Diambil sel MCF-7 dari inkubator CO₂, diamati kondisi sel.
- 2) Dipanen sel sesuai dengan protokol panen.

- 3) Dihitung jumlah sel MCF-7 sesuai dengan protokol penghitungan sel (jumlah sel yang dibutuhkan untuk uji imunositokimia adalah 5×10^4 sel/sumuran (5×10^4 sel/1000 μ l DMEM)).
- 4) Dibuat pengenceran suspensi sel sehingga konsentrasi sel akhir 5×10^4 sel/1000 μ l DMEM.
- 5) Disiapkan *24 well plate* dan *cover slip*.
- 6) Dimasukkan *cover slip* sejumlah yang dibutuhkan ke dalam sumuran menggunakan pinset dengan hati-hati.
- 7) Ditransfer 1000 μ l DMEM suspensi sel ke atas *cover slip*.
- 8) Diamati keadaan sel di mikroskop untuk melihat distribusi sel.
- 9) Diinkubasi sel di dalam inkubator selama semalam.
- 10) Dibuat tiga konsentrasi sampel (ekstrak daun kelor (*M. oleifera*)), yaitu pada IC_{50} , dua kali IC_{50} , dan setengah kali IC_{50} , untuk perlakuan sebanyak 1000 μ l. Untuk imunositokimia, minimal diperlukan 3 perlakuan : a. Perlakuan dengan ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) , b. Kontrol sel tanpa antibodi primer (akan menunjukkan warna ungu), c. Kontrol sel dengan antibodi primer (akan menunjukkan warna coklat).
- 11) Diambil *24 well plate* yang telah berisi sel dari inkubator CO_2 .
- 12) Dibuang semua media kultur dari sumuran.
- 13) Diisikan PBS masing-masing 500 μ l ke dalam sumuran untuk mencuci sel.
- 14) Dibuang PBS dari sumuran.
- 15) Dimasukkan tiga sampel dengan konsentrasi ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) sesuai poin 10 sebanyak 1000 μ l ke dalam sumuran.
- 16) Dimasukkan 1000 μ l media kultur untuk kontrol sel.

- 17) Diinkubasi di dalam inkubator CO₂ selama 15 jam.
- 18) Diamati kondisi sel setelah 14 jam, didokumentasikan dengan kamera.
- 19) Disiapkan metanol dingin dan PBS.
- 20) Diinkubasi dengan sampel dihentikan pada jam ke-15 (Pekerjaan selanjutnya, tidak perlu di dalam LAF)
- 21) Dibuang semua media dari sumuran.
- 22) Disikan PBS 500 µl ke dalam masing-masing sumuran secara perlahan untuk mencuci sel.
- 23) Dibuang PBS dari sumuran.
- 24) Diambil *cover slip* menggunakan pinset dengan bantuan ujung jarum dengan hati-hati.
- 25) Diletakkan di atas tisu kering dan diberi label.
- 26) Ditempelkan *cover slip* di atas *slide* menggunakan entelan, ditunggu hingga kering.
- 27) Ditetaskan 2 tetes PBS pada masing-masing *cover slip*, didiamkan selama 5 menit, dibuang larutan PBS tersebut. Langkah ini dilakukan sebanyak 2 kali.
- 28) Ditetaskan larutan hidrogen peroksida (*blocking solution*), diinkubasi selama 10 menit, dibuang larutan.
- 29) Ditetaskan 2 tetes PBS pada masing-masing *cover slip*, didiamkan selama 5 menit, dibuang larutan PBS tersebut. Langkah ini dilakukan sebanyak 2 kali.
- 30) Ditetaskan *prediluted blocking serum*, diinkubasi selama 10 menit, dibuang larutan.

- 31) Ditetaskan 2 tetes PBS pada masing-masing *cover slip*, didiamkan selama 5 menit, dibuang larutan PBS tersebut. Langkah ini dilakukan sebanyak 2 kali.
- 32) Ditetaskan 50 μ l antibodi monoklonal primer untuk antigen yang ingin diamati, yaitu untuk caspase-9, disimpan pada wadah yang sudah dilapisi tisu basah, didiamkan selama 2 jam, dibuang larutan antibodi monoklonan primer.
- 33) Ditetaskan 2 tetes PBS pada masing-masing *cover slip*, didiamkan selama 5 menit, dibuang larutan PBS tersebut. Langkah ini dilakukan sebanyak 3 kali.
- 34) Ditetaskan antibodi sekunder yang dilabel biotin (*biotinylated universal secondary antibody*), diinkubasi selama 1 jam pada wadah yang telah dilapisi tisu basah, dibuang larutan antibodi sekunder.
- 35) Ditetaskan 2 tetes PBS pada masing-masing *cover slip*, didiamkan selama 5 menit, dibuang larutan PBS tersebut. Langkah ini dilakukan sebanyak 3 kali.
- 36) Ditetaskan reagen yang berisi kompleks streptavidin-enzim peroksidase, diinkubasi selama 40 menit, dibuang larutan kompleks streptavidin-enzim peroksidase.
- 37) Ditetaskan 2 tetes PBS pada masing-masing *cover slip*, didiamkan selama 5 menit, dibuang larutan PBS tersebut. Langkah ini dilakukan sebanyak 2 kali.
- 38) Ditetaskan 2 tetes aquades pada masing-masing *cover slip*, didiamkan selama 5 menit, dibuang aquades tersebut. Langkah ini dilakukan sebanyak 2 kali.

- 39) Ditetaskan larutan substrat kromogen DAB, diinkubasi selama 15 menit, dibuang larutan substrat kromogen DAB.
- 40) Ditetaskan 2 tetes aquades pada masing-masing *cover slip*, didiamkan selama 5 menit, dibuang aquades tersebut. Langkah ini dilakukan sebanyak 3 kali.
- 41) Dialiri menggunakan aquades hingga bersih.
- 42) Ditetaskan larutan Mayer Haematoxylin, diinkubasi selama 3 menit.
- 43) Dialiri menggunakan aquades hingga bersih dari larutan Mayer Haematoxylin.
- 44) Dikeringkan pada suhu ruang.
- 45) Ditempel masing-masing dengan *cover slip* menggunakan entelan, tunggu hingga kering dan dipastikan tidak ada gelembung. Disimpan pada suhu ruang.
- 46) Diamati ekspresi protein dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x dan difoto.
- 47) Dihitung Indeks ekspresi caspase-9 dengan menghitung jumlah sel yang terekspresi dan jumlah sel total dalam satu lapang pandang. Masing-masing pengulangan pada setiap perlakuan dilihat dari 10 lapang pandang yang berbeda. Selanjutnya, sel yang terekspresi dan total sel dijumlah. Indeks ekspresi caspase-9 adalah persentase perbandingan total sel yang terekspresi dan total seluruh sel dari 10 lapang pandang

4.7.7 Uji Apoptosis dengan TUNEL Assay

- 1) Sel dipreparasi dengan *fixation solution* selama 1 jam pada suhu $\pm 25^{\circ}\text{C}$
- 2) Dicuci dengan PBS
- 3) Diinkubasi *blocking solution* selama 10 menit pada suhu $15-25^{\circ}\text{C}$
- 4) Dicuci dengan PBS
- 5) Diinkubasi dengan *permeabilisation solution* selama 2 menit di es pada suhu $2-8^{\circ}\text{C}$
- 6) Dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali
- 7) Dikeringkan bagian disekitar sampel
- 8) Ditambahkan *TUNEL Reaction Mixture* 50 μl
- 9) Sampel ddiletakan diwadah tertutup dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C dalam keadaan lembab dan gelap
- 10) Dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali
- 11) Ditetesi PBS dan diamati di mikroskop
- 12) Dikeringkan bagian disekitar sampel
- 13) Ditambah 50 μl *converter POD*
- 14) Diinkubasi pada tempat lembab selama 30 menit pada suhu 37°C
- 15) Dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali
- 16) Ditambah 50-100 μl substrat DAB
- 17) Diinkubasi selama 10 menit pada suhu $15-25^{\circ}\text{C}$
- 18) Dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali
- 19) Ditetesi mayer dan aquades dan ditunggu hingga warna pada sampel biru keunguan
- 20) Dicuci dengan aquades
- 21) Dikeringkan dalam oven sampe kering

22) Bagian atas sampel ditutup dengan coverslip menggunakan entelan dan ditunggu hingga kering

23) Diamati hasilnya di mikroskop

24) Dihitung Indeks apoptosis dengan menghitung jumlah sel yang mengalami apoptosis dan jumlah sel total dalam satu lapang pandang. Masing-masing pengulangan pada setiap perlakuan dilihat dari 10 lapang pandang yang berbeda. Selanjutnya, sel yang apoptosis dan total sel dijumlah. Indeks apoptosis adalah persentase perbandingan total sel yang apoptosis dan total seluruh sel dari 10 lapang pandang

4.8 Analisis Data

Data yang terkumpul diolah dan dianalisis uji normalitas data untuk mengetahui sebaran data terdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas dilakukan dengan uji normalitas kolmogorov-smirnov. Data dapat dikatakan normal jika besarnya nilai signifikan lebih dari 0,05 ($\alpha = 0,05$). Selain itu, juga dilakukan uji homogenitas varian untuk mengetahui apakah data homogen. Setelah diketahui data memiliki distribusi yang normal dan data juga homogen maka dianalisa menggunakan uji parametrik yaitu uji *One-Way ANOVA*. Selain itu, bisa dilakukan uji korelasi untuk melihat apakah ada hubungan antara pemberian ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) terhadap ekspresi caspase-9 dan apoptosis sel MCF-7.

Hipotesis statistik apoptosis sel:

H0: Tidak terjadi penurunan jumlah sel kanker payudara MCF-7 yang menunjukkan bahwa tidak terjadi apoptosis sel setelah diberikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*)

H1: Terjadi penurunan jumlah sel kanker payudara MCF-7 yang menunjukkan bahwa terjadi apoptosis sel setelah diberikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*)

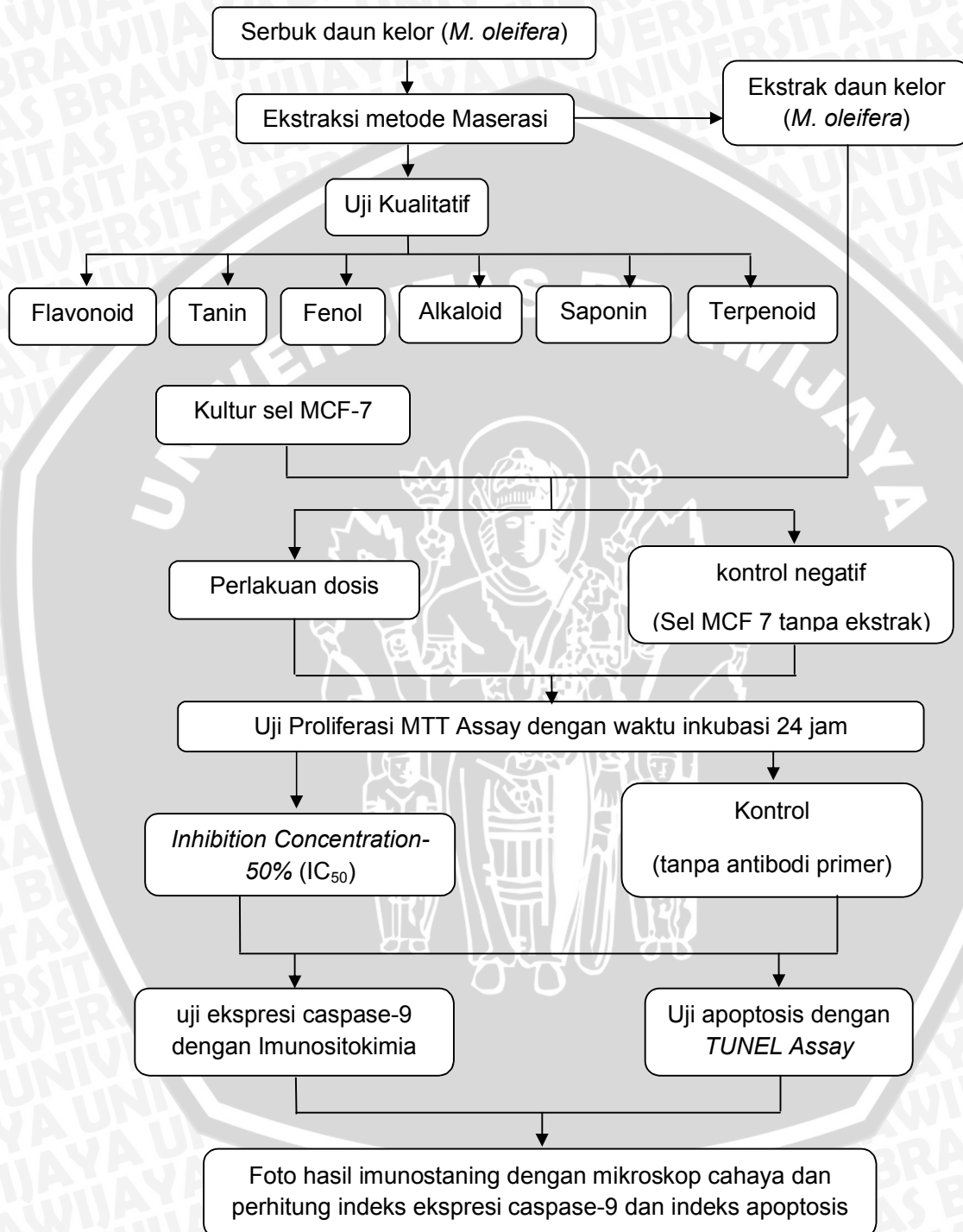
Hipotesis ekspresi caspase-9:

H0: Tidak terjadi peningkatan ekspresi caspase-9 yang menunjukkan bahwa ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) tidak mempengaruhi ekspresi caspase-9 pada sel MCF-7

H1: Terjadi peningkatan ekspresi caspase-9 yang menunjukkan bahwa ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) mempengaruhi ekspresi caspase-9 pada sel MCF-7



4.1 Kerangka Penelitian



Gambar 4.1 Bagan Desain Penelitian

Keterangan:

Dosis MTT 1: seri dosis 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125 µg/ml dan dosis kelipatan 50 yakni 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, dan 700 µg/ml dengan waktu inkubasi 24 jam.

Dosis MTT 2: seri dosis 20.000, 10.000, 5000, 2500, 1250 µg/ml dan dosis kelipatan 200 yang terdiri dari 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2200, 2400, 2600, 2800, 3000, 3200, 3400, 3600, 3800, 4000, 4200, 4400, 4600, 4800, 5200, 5400, 5600, 5800, 6000 dan 6200 µg/ml.

Dosis Imunositokimia Caspase-9 dan Apoptosis : $\frac{1}{2} \times IC_{50}$, IC_{50} , $2 \times IC_{50}$.



BAB 5

HASIL PENELITIAN dan ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil Ekstraksi dan Uji Fitokimia Ekstrak

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi untuk mendapatkan ekstrak daun kelor (*M. oleifera*). Ekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% untuk merendam serbuk daun kelor yang dilakukan selama 24 jam dan dilakukan re-maserasi sebanyak dua kali. Total etanol 70% yang digunakan sebanyak 3 liter untuk merendam 100 gram serbuk daun kelor (*M. oleifera*). Filtrat yang didapatkan dari ekstraksi adalah sebanyak 2463,8 ml. Selanjutnya dilakukan pemisahan ekstrak dengan pelarut menggunakan rotary evaporator pada suhu 40 °C untuk menghindari rusaknya zat aktif yang terkandung dalam daun kelor (*M. oleifera*) jika dipapar pada suhu tinggi. Setelah itu, dilakukan pengeringan ekstrak dengan *vacum oven* dan didapatkan hasil ekstrak pekat daun kelor (*M. oleifera*) sebanyak 37,81 gram. Dari pengamatan secara organoleptik didapatkan ekstrak berwarna hijau tua kehitaman, konsistensi pekat, berbau khas daun kelor. Untuk mengetahui kandungan ekstrak daun kelor (*M. oleifera*), maka dilakukan uji fitokimia secara kualitatif pada ekstrak (lampiran 4). Hasil uji fitokimia dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Kelor (*M. oleifera*)

Uji	Reagen	Hasil
Tanin	FeCl ₃	+
Alkaloid	Dragendorff	+
Fenol	FeCl ₃	+
Saponin	Aquades	+
Flavonoid	NaOH + HCl	+
Terpenoid	H ₂ SO ₄	-

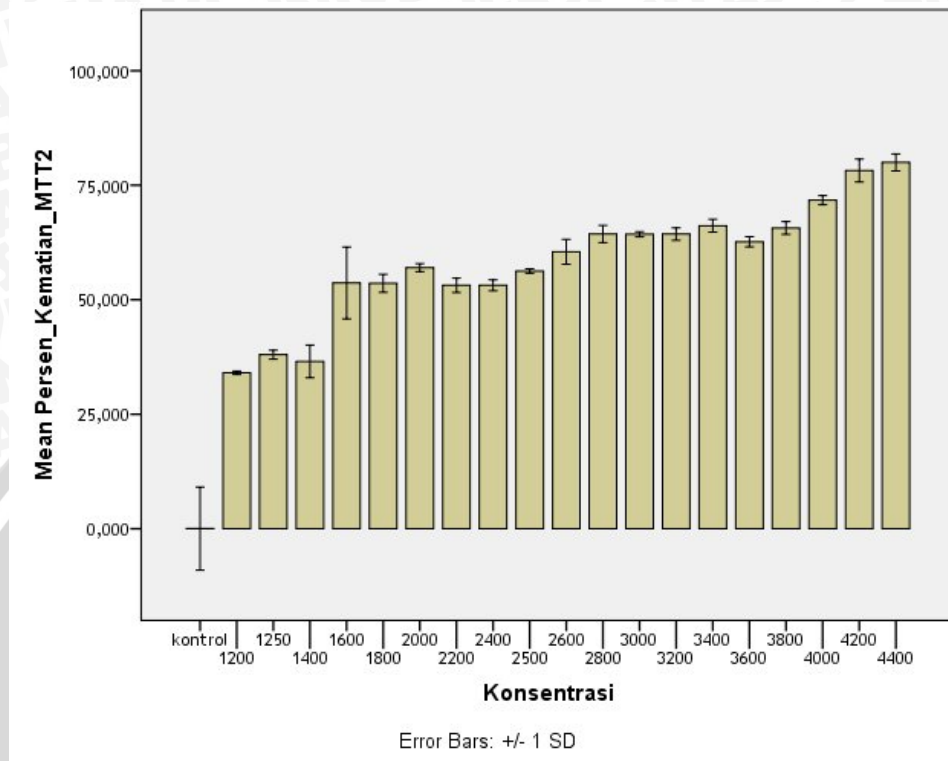
Berdasarkan tabel 5.1 diketahui bahwa ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) mengandung tanin, alkaloid, fenol, saponin dan flavonoid. Hasil uji fitokimia menunjukan ekstrak tidak mengandung terpenoid.

5.1.2 Penentuan IC₅₀

Pada MTT 1 didapatkan absorbansi masing-masing konsentrasi (lampiran 5) yang digunakan untuk menghitung persentase rata-rata hambatan proliferasi sel (lampiran 6). Pada MTT 1, persentase rata-rata hambatan proliferasi sel MCF-7 masih belum sampai 50% (lampiran 7 dan 8) sehingga dilanjutkan pada MTT 2 untuk menemukan dosis IC₅₀ (*Inhibition Concentration 50%*). Dari percobaan MTT 2 didapatkan absorbansi masing-masing konsentrasi (lampiran 7). Selanjutnya, dilakukan perhitungan persen rata-rata hambatan proliferasi sel MCF-7 MTT 2 (Lampiran 10). Rata-rata persen hambatan proliferasi sel hasil MTT 2 dapat dilihat pada tabel 5.2 dan gambar 5.1.

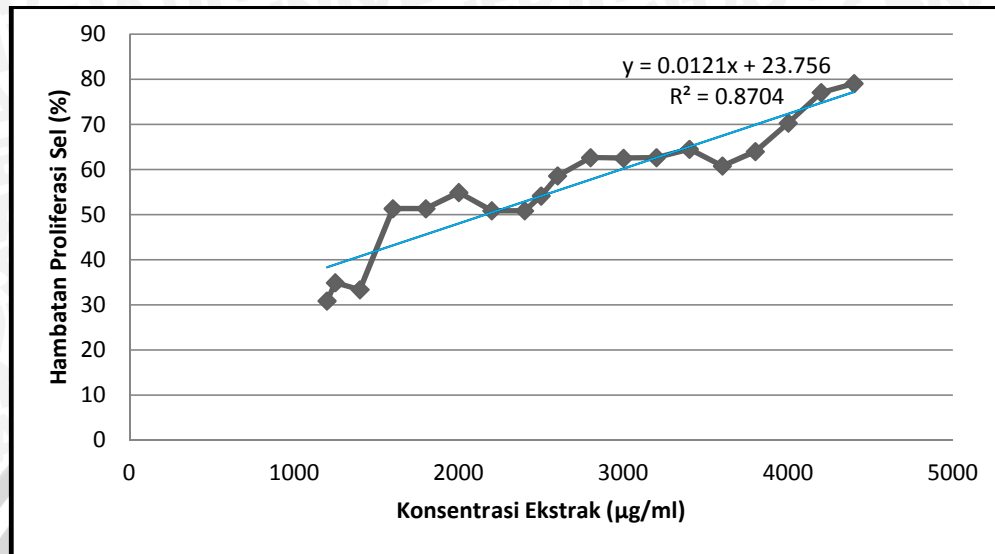
Tabel 5.2 Persen rata-rata hambatan proliferasi sel MCF-7 MTT 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Rata-Rata Hambatan Proliferasi Sel (%)	Standar Deviasi
20.000	75,00	0,527
10.000	78,68	0,467
6200	76,35	1,702
6000	76,35	1,104
5800	75,25	0,243
5600	77,70	0,350
5400	79,90	0,760
5200	79,40	0,243
5000	73,90	1,313
4800	80,90	0,467
4600	80,30	1,214
4400	79,04	1,863
4200	77,07	2,498
4000	70,30	1,012
3800	63,97	1,402
3600	60,78	1,123
3400	64,50	1,384
3200	62,62	1,369
3000	62,50	0,552
2800	62,62	1,878
2600	58,58	2,708
2500	54,17	0,472
2400	50,86	1,186
2200	50,86	1,572
2000	54,90	0,882
1800	51,34	1,963
1600	51,34	7,847
1400	33,46	3,563
1250	34,93	0,980
1200	30,88	0,376



Gambar 5.1 Grafik rata-rata hambatan proliferasi sel MCF-7 MTT 2

Dari hasil rata-rata persen hambatan proliferasi sel hasil MTT Assay 2, kemungkinan IC_{50} berada pada rentang konsentrasi dibawah 2800 $\mu\text{g/ml}$ sehingga dilakukan uji regresi linier pada rentang konsentrasi 1200 $\mu\text{g/ml}$ - 2800 $\mu\text{g/ml}$. Hasil regresi linier dapat dilihat pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2 Kurva Dosis Ekstrak terhadap Hambatan Proliferasi Sel

Dari hasil regresi linier, diketahui persamaan regresinya $y = 0,012x + 23,76$ dengan $R^2 = 0,870$, R^2 mendekati 1 maka hubungan linier antara konsentrasi dan persen hambatan proliferasi sel yang cukup baik. Perhitungan IC_{50} dihitung menggunakan persamaan regresi linier :

$$y = 0,012x + 23,76$$

$$50 = 0,012x + 23,76$$

$$x = 2186$$

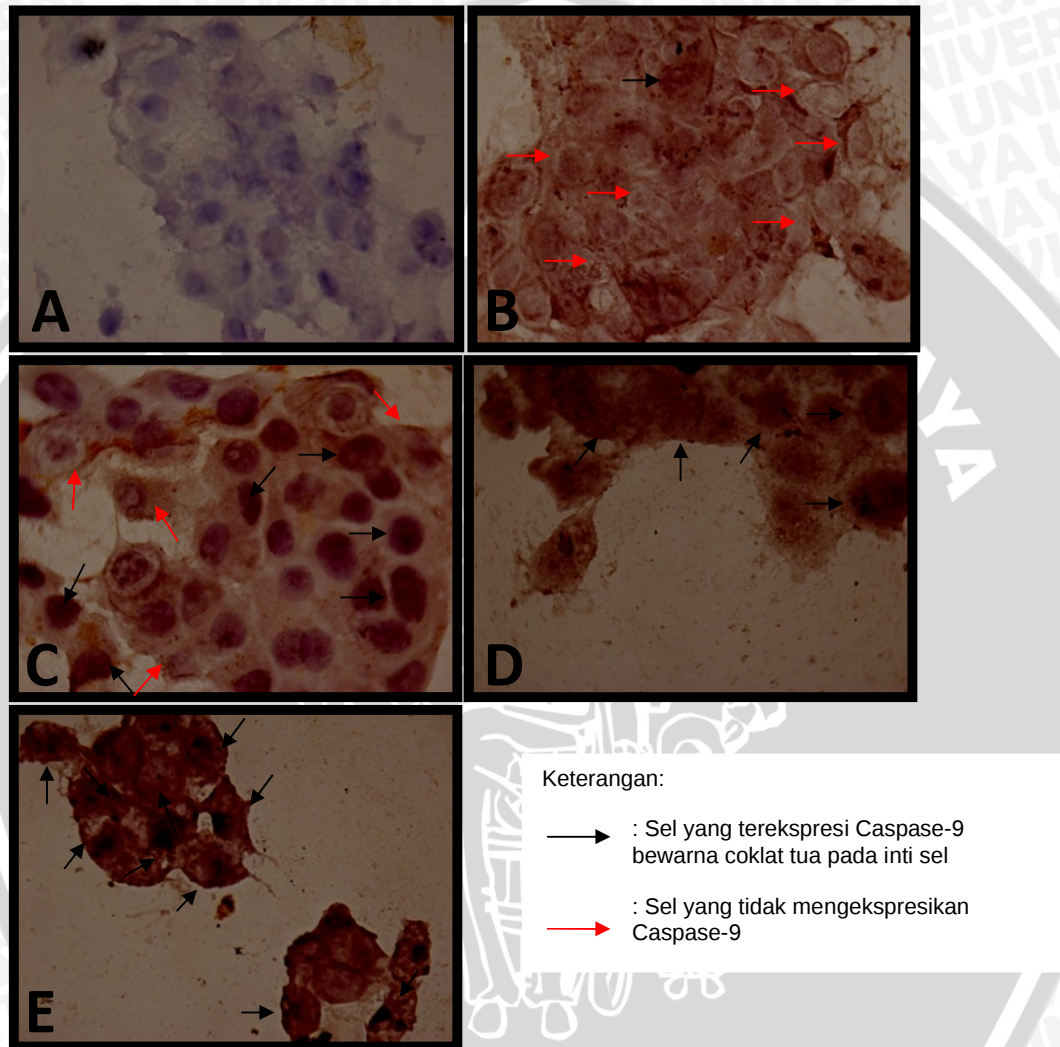
Perhitungan persen hambatan proliferasi sel MCF-7 MTT 2 didapatkan bahwa IC_{50} berada pada konsentrasi 2186 µg/ml. Dikarenakan dari semua konsentrasi percobaan MTT 2, konsentrasi yang paling mendekati 50% ada pada konsentrasi 2200 µg/ml yakni sebesar 50,86 %, maka IC_{50} yang digunakan dalam penelitian ini digenapkan menjadi 2200 µg/ml.

5.1.3 Hasil Uji Ekspresi Caspase-9

Dalam penelitian ini terdapat 5 kelompok perlakuan yakni kontrol tanpa antibodi (tanpa perlakuan ekstrak dan tanpa diberi antibodi caspase-9), kontrol perlakuan (Tanpa perlakuan ekstrak), perlakuan dengan konsentrasi setengah IC_{50} (1100 $\mu\text{g/ml}$), perlakuan dengan konsentrasi IC_{50} (2200 $\mu\text{g/ml}$), perlakuan dengan konsentrasi dua kali IC_{50} (4400 $\mu\text{g/ml}$), dengan pengulangan pada masing-masing perlakuan sebanyak 6 kali. Ekspresi yang diamati adalah ekspresi caspase-9 yang menunjukkan warna coklat pada sitosol dan nukleus. Pengamatan ekspresi caspase-9 dilakukan dengan metode imunositokimia dengan menggunakan antibodi caspase-9. Pengamatan mikroskopik dari ekspresi caspase-9 dapat dilihat pada Gambar 5.3 dan contoh dari masing-masing pengulangan pada Lampiran 11.

Dari penampakan mikroskopik, pada kontrol sel tanpa antibodi primer (caspase-9) menunjukkan semua sel berwarna ungu muda. Kontrol tanpa antibodi primer menunjukkan tidak adanya ikatan antara antibodi primer dan antibodi sekunder yang akan terlihat (Burry, 2011), dalam hal ini tidak ada ekspresi caspase-9 yang akan terlihat, sehingga indeks ekspresi caspase-9 pada kelompok tanpa antibodi tidak dihitung, hanya untuk membuktikan bahwa tidak ada kesalahan dari prosedur yang digunakan. Kelompok kontrol perlakuan memperlihatkan ekspresi caspase-9 paling sedikit dari kelompok perlakuan lainnya. Perlakuan dengan konsentrasi setengah IC_{50} (1100 $\mu\text{g/ml}$) memperlihatkan peningkatan ekspresi caspase-9 yang ditandai dengan inti sel yang berwarna coklat lebih banyak. Pada perlakuan dengan konsentrasi IC_{50} (2200 $\mu\text{g/ml}$) memperlihatkan sel berwarna coklat lebih gelap dan semakin banyak yang mengekspresikan caspase-9. Pada perlakuan dengan konsentrasi

dua kali IC_{50} (4400 $\mu\text{g/ml}$) memperlihatkan hampir semua sel berwarna coklat tua menunjukkan ekspresi caspase-9 tertinggi dari kelompok perlakuan.



Gambar 5.3. Pengecatan Imunositokimia Caspase-9 pada Sel MCF-7 Setelah Perlakuan. (A) Kontrol tanpa antibodi caspase-9, (B) Kontrol Perlakuan (tanpa ekstrak), (C) Dosis 1100 $\mu\text{g/ml}$ ($1/2 \times IC_{50}$), (D) Dosis 2200 $\mu\text{g/ml}$ (IC_{50}), (E) Dosis 4400 $\mu\text{g/ml}$ ($2 \times IC_{50}$). Foto diambil menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000 kali

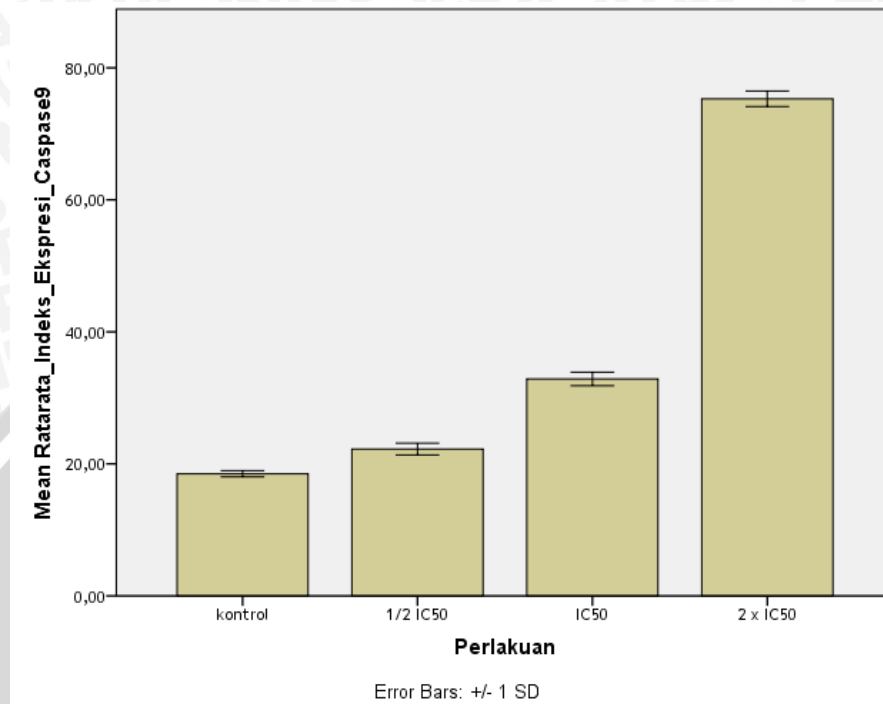
Indeks ekspresi caspase-9 didapatkan dengan menghitung jumlah sel yang mengekspresikan caspase-9 dan jumlah sel total dalam satu lapang pandang. Masing-masing pengulangan pada setiap perlakuan dilihat dari 10

lapang pandang yang berbeda. Selanjutnya, sel yang mengekspresikan caspase-9 dan total sel dijumlah. Indeks ekspresi caspase-9 adalah persentase perbandingan total sel yang mengekspresikan caspase-9 dan total seluruh sel dari 10 lapang pandang (lampiran 12). Hasil indeks ekspresi caspase-9 kemudian dirata-ratakan dan tercantum pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3 Rata-rata Indeks Ekspresi Caspase-9 pada Masing-masing Perlakuan

Replikasi	Perlakuan			
	kontrol	konsentrasi 1100 $\mu\text{g/ml}$ ($\frac{1}{2} \text{IC}_{50}$)	konsentrasi 2200 $\mu\text{g/ml}$ (IC_{50})	konsentrasi 4400 $\mu\text{g/ml}$ ($2 \times \text{IC}_{50}$)
1	18,66	22,04	32,19	73,39
2	18,75	23,81	33,45	75,73
3	18,75	21,39	34,54	74,31
4	17,69	22,73	31,54	75,96
5	18,95	21,53	32,74	76,42
6	18,18	21,97	32,71	76,00
Rata-rata $\pm$ standar deviasi	18,50 % $\pm$ 0,471	22,25 % $\pm$ 0,899	32,86 % $\pm$ 1,039	75,30 % $\pm$ 1,183

Pada kelompok kontrol perlakuan, rata-rata indeks sel yang mengekspresikan caspase-9 adalah 18,50 % $\pm$ 0,471. Pada konsentrasi 1100 $\mu\text{g/ml}$ ($\frac{1}{2} \times \text{IC}_{50}$), rata-rata indeks sel yang mengekspresikan caspase-9 adalah 22,25 % $\pm$ 0,899. Pada konsentrasi 2200 $\mu\text{g/ml}$ (IC_{50}), rata-rata indeks sel yang mengekspresikan caspase-9 adalah 32,86 % $\pm$ 1,039. Pada konsentrasi 4400 $\mu\text{g/ml}$ ($2 \times \text{IC}_{50}$), rata-rata indeks sel yang mengekspresikan caspase-9 adalah 75,30 % $\pm$ 1,183.



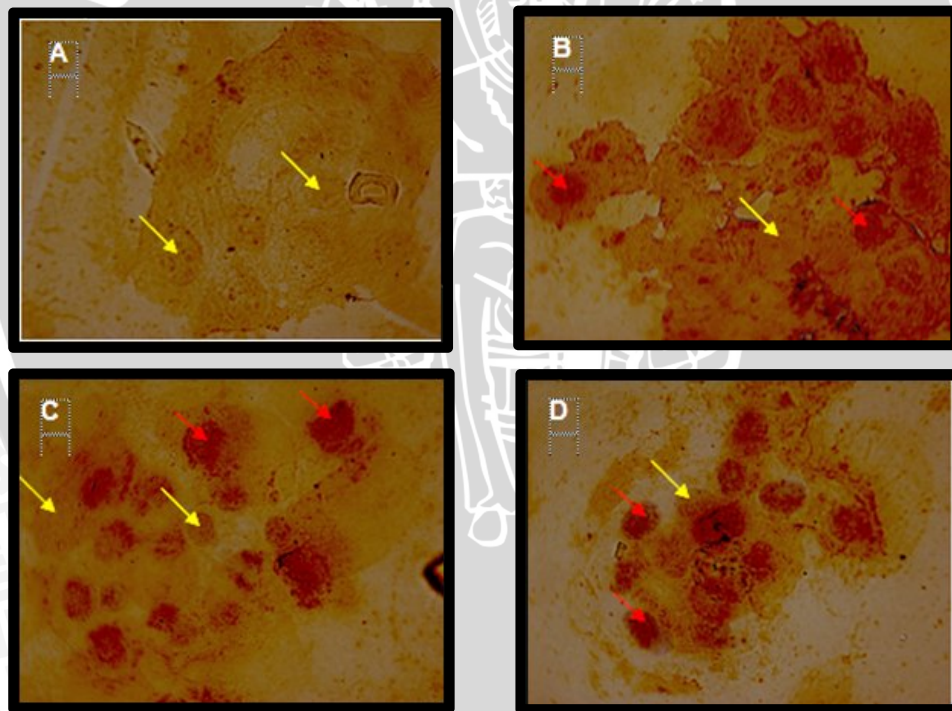
Gambar 5.4. Grafik Pengaruh Dosis Ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) terhadap Rata-rata Indeks Ekspresi Caspase-9 pada Sel MCF-7

5.1.4 Hasil Uji Apoptosis

Dalam penelitian ini terdapat 4 kelompok perlakuan yakni kontrol perlakuan (Tanpa perlakuan ekstrak), perlakuan dengan konsentrasi setengah IC₅₀ (1100 µg/ml), perlakuan dengan konsentrasi IC₅₀ (2200 µg/ml), perlakuan dengan konsentrasi dua kali IC₅₀ (4400 µg/ml), dengan pengulangan pada masing-masing perlakuan sebanyak 6 kali, tetapi pada setiap pengulangan hanya terdiri dari 2 lapang pandang saja karena keterbatasan jumlah sel. Diamati apoptosis sel MCF-7 yang menunjukkan warna coklat pada sitosol dan nukleus. Pengamatan mikroskopik dapat dilihat pada Gambar 5.6 dan lampiran 13

Dari penampakan mikroskopik, pada kelompok kontrol perlakuan memperlihatkan apoptosis paling sedikit dari kelompok perlakuan lainnya.

Perlakuan dengan konsentrasi setengah IC_{50} (1100 $\mu\text{g/ml}$) memperlihatkan peningkatan apoptosis yang ditandai dengan inti sel yang berwarna coklat lebih banyak. Pada perlakuan dengan konsentrasi IC_{50} (2200 $\mu\text{g/ml}$) memperlihatkan sel berwarna coklat lebih gelap dan semakin banyak sel yang apoptosis. Pada perlakuan dengan konsentrasi dua kali IC_{50} (4400 $\mu\text{g/ml}$) memperlihatkan hampir semua sel berwarna coklat tua menunjukkan apoptosis tertinggi dari kelompok perlakuan. Selanjutnya, dihitung Indeks apoptosis yakni persentase perbandingan total sel yang apoptosis dan total seluruh sel dari 2 lapang pandang (lampiran 14). Hasil indeks apoptosis kemudian dirata-ratakan dan tercantum pada Tabel 5.4.



Gambar 5.5. Hasil Tunel Assay pada Sel MCF-7 setelah Perlakuan. (A) Kontrol Perlakuan (tanpa ekstrak), (B) Dosis 1100 $\mu\text{g/ml}$ ($1/2 \times IC_{50}$), (C) Dosis 2200 $\mu\text{g/ml}$ (IC_{50}), (D) Dosis 4400 $\mu\text{g/ml}$ ($2 \times IC_{50}$). Foto diambil menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x

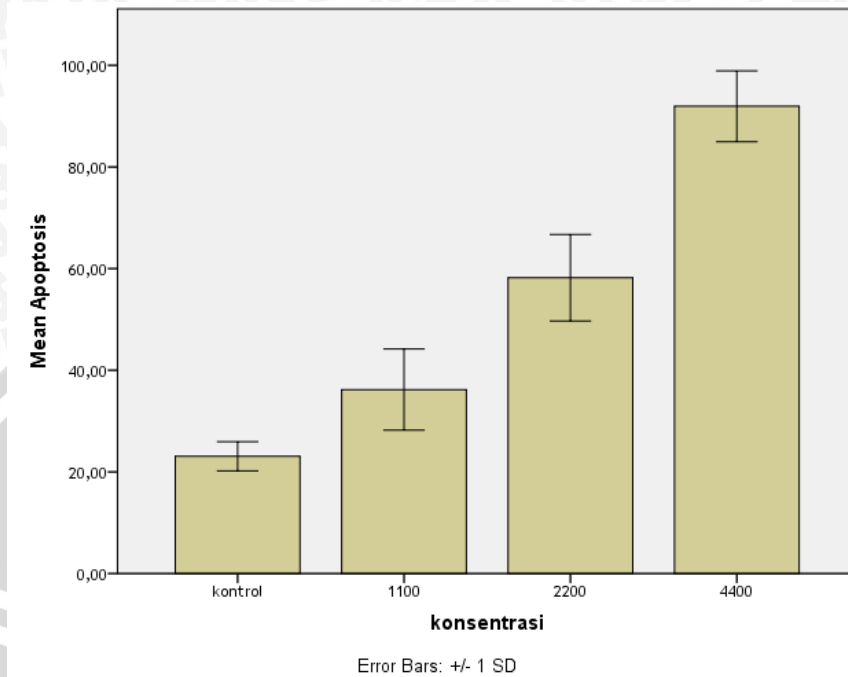
Keterangan:

- : Sel yang apoptosis berwarna coklat tua pada sitosol dan inti sel
- : Sel yang tidak apoptosis

Tabel 5.4 Rata-rata Indeks Apoptosis pada Masing-masing Perlakuan

Replikasi	Perlakuan			
	Kontrol	konsentrasi 1100 $\mu\text{g/ml}$ ($\frac{1}{2}$ IC ₅₀)	konsentrasi 2200 $\mu\text{g/ml}$ (IC ₅₀)	konsentrasi 4400 $\mu\text{g/ml}$ (2x IC ₅₀)
1	21,74	27,78	64	79,17
2	26,67	33,33	54,17	91,67
3	25	38,89	45,45	92,31
4	25	45,45	68	100
5	20	44,44	53,66	92,86
6	20	27,27	64	95,65
Rata-rata $\pm$ standar deviasi	23,07 % $\pm$ 2,865	36,19 % $\pm$ 7,995	58,21 % $\pm$ 8,514	91,94 % $\pm$ 6,969

Pada kelompok kontrol perlakuan, rata-rata indeks sel yang apoptosis adalah 23,07 % $\pm$ 2,865. Pada konsentrasi 1100 $\mu\text{g/ml}$ ($\frac{1}{2}\text{xIC}_{50}$), rata-rata indeks sel yang apoptosis adalah 36,19 % $\pm$ 7,995. Pada konsentrasi 2200 $\mu\text{g/ml}$ (IC₅₀), rata-rata indeks sel yang apoptosis adalah 58,21 % $\pm$ 8,514. Pada konsentrasi 4400 $\mu\text{g/ml}$ (2xIC₅₀), rata-rata indeks sel yang apoptosis adalah 91,94 % $\pm$ 6,969.



Gambar 5.6. Grafik Pengaruh Dosis Ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) terhadap Rata-rata Indeks Apoptosis Sel MCF-7

5.2 Analisa Data

Data yang didapatkan dalam penelitian ini dianalisis menggunakan analisis varian atau *one way* ANOVA. Konsentrasi ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) memiliki perbedaan signifikan pada variabel terikat (persen hambatan proliferasi, ekspresi caspas-9, apoptosis) apabila nilai signifikansi kurang dari 0,05 ($p < 0,05$). Sebelum dianalisis dengan ANOVA, data harus memiliki sebaran data yang normal dan varian harus sama (homogen). Dilakukan uji normalitas untuk menguji distribusi data apakah data terdistribusi normal atau tidak, uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel kurang dari 50. Data terdistribusi normal apabila nilai signifikansi lebih dari 0,05 ($p > 0,05$). Uji homogenitas dilakukan untuk mengetahui bahwa semua sampel berasal dari varian yang sama, uji homogenitas menggunakan *Levene test*. Data dikatakan

homogen apabila nilai signifikansi lebih dari 0,05 ($p > 0,05$). Selanjutnya dilakukan uji kerelasi untuk mengetahui apakah ada hubungan antara pemberian ekstrak dengan variabel terikat. Uji korelasi menggunakan *Pearson test* dengan nilai signifikansi kurang dari 0,05 ($p < 0,05$).

5.2.1 MTT percobaan dosis 2

5.2.1.1 Analisis Deskriptif MTT 2

Dari hasil analisis deskriptif (lampiran 15) diketahui bahwa persen hambatan proliferasi MTT percobaan dosis 2 memiliki prosentase rata-rata sebesar 63,83 % dengan nilai minimal -9,35% dan nilai maksimal 82,24%.

5.2.1.2 Uji Normalitas MTT 2

Dari hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk* (lampiran 16), nilai signifikansi semua konsentrasi secara keseluruhan adalah 0,000. Nilai signifikan menunjukan kurang dari 0,05 ($p < 0,05$) sehingga data secara keseluruhan terdistribusi tidak normal. Jika dilihat pada masing-masing konsentrasi, diketahui bahwa data tidak normal yang menunjukkan nilai signifikansi kurang dari 0,05 ($p < 0,05$) ada pada konsentrasi 4600 $\mu\text{g/ml}$, 4000 $\mu\text{g/ml}$, 2500 $\mu\text{g/ml}$.

5.2.1.3 Uji Homogenitas MTT 2

Dari hasil uji homogenitas *Levene* (lampiran 17), nilai signifikansi data adalah 0,000. Nilai signifikan menunjukan kurang dari 0,05 ($p < 0,05$) sehingga data memiliki varian yang tidak sama (tidak homogen).

5.2.1.4 Uji *Kruskal Wallis* MTT 2

Dikarenakan pada uji asumsi ANOVA (uji normalitas dan uji homogenitas) tidak terpenuhi yakni data tidak normal dan tidak homogen maka digunakan uji nonparametrik *Kruskal Wallis*. Dari hasil uji *Kruskal Wallis* (lampiran 18), nilai signifikansi data adalah 0,000. Nilai signifikan menunjukkan kurang dari 0,05 ($p < 0,05$) sehingga konsentrasi ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) memiliki perbedaan signifikan pada persen hambatan proliferasi.

5.2.1.5 Analisis *Spearman* MTT 2

Digunakan uji nonparametrik *Spearman* untuk melihat hubungan antara konsentrasi dan persen hambatan proliferasi. Dari hasil analisis *Spearman* (lampiran 19), nilai signifikansi data adalah 0,000. Nilai signifikan menunjukkan kurang dari 0,01 ($p < 0,01$). Sedangkan Koefisien korelasinya adalah 0,881 sehingga dapat disimpulkan bahwa ada hubungan yang kuat antara persen hambatan proliferasi dengan konsentrasi daun kelor (*M. oleifera*) yang digunakan, nilai korelasi positif menandakan semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi persen hambatan proliferasi.

5.2.2 Caspase-9

5.2.2.1 Analisis Deskriptif Indeks Ekspresi Caspase-9

Dari hasil analisis deskriptif (lampiran 20) diketahui bahwa pemberian ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) pada konsentrasi 1100 $\mu\text{g/ml}$ ($1/2 \times \text{IC}_{50}$) 2200 $\mu\text{g/ml}$ (IC_{50}), 4400 $\mu\text{g/ml}$ ($2 \times \text{IC}_{50}$) memiliki rata-rata indeks ekspresi caspase-9 yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan kontrol.

5.2.2.2 Uji Normalitas Indeks Ekspresi Caspase-9

Dari hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk* (lampiran 21), nilai signifikansi kontrol, setengah IC_{50} , IC_{50} dan $2 \times IC_{50}$ masing-masing adalah 0,191; 0,327; 0,874; dan 0,168. Dari semua data, nilai signifikan menunjukkan lebih dari 0,05 ($p > 0,05$) sehingga semua data terdistribusi normal.

5.2.2.3 Uji Homogenitas Indeks Ekspresi Caspase-9

Dari hasil uji homogenitas *Levene* (lampiran 22), nilai signifikansi data adalah 0,248. Nilai signifikan menunjukkan lebih dari 0,05 ($p > 0,05$) sehingga data memiliki varian yang sama (homogen).

5.2.2.4 Analisis Varian (ANOVA) Indeks Ekspresi Caspase-9

Dari hasil analisis varian ANOVA (lampiran 23), nilai signifikansi data adalah 0,000. Nilai signifikan menunjukkan kurang dari 0,05 ($p < 0,05$) sehingga konsentrasi ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) memiliki perbedaan signifikan pada ekspresi caspas-9.

5.2.2.5 Uji *Post Hoc* Indeks Ekspresi Caspase-9

Uji *Post Hoc* digunakan untuk melihat konsentrasi mana yang memiliki perbedaan indeks ekspresi caspase-9 yang signifikan. Dari hasil uji *Post Hoc Tukey* (lampiran 24), diketahui pada semua data bahwa terdapat perbedaan indeks ekspresi caspase-9 yang signifikan antar konsentrasi ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) yang ditandai dengan nilai signifikan semua data kurang dari 0,05 ($p < 0,05$).

Tabel 5.5 Hasil Signifikansi Uji *Post Hoc* Caspase-9

	Kontrol	$\frac{1}{2} \times \text{IC}_{50}$	IC_{50}	$2 \times \text{IC}_{50}$
Kontrol	-	0,000	0,000	0,000
$\frac{1}{2} \times \text{IC}_{50}$	0,000	-	0,000	0,000
IC_{50}	0,000	0,000	-	0,000
$2 \times \text{IC}_{50}$	0,000	0,000	0,000	-

5.2.2.6 Uji Korelasi Indeks Ekspresi Caspase-9

Dari hasil uji korelasi *Pearson* (lampiran 25), didapatkan korelasi antara konsentrasi dan indeks ekspresi caspase-9 adalah 0,895, hal ini menunjukkan bahwa terjadi hubungan yang kuat antara konsentrasi dan indeks ekspresi caspase-9. Nilai signifikansi data adalah 0,000. Nilai signifikan menunjukan kurang dari 0,05 ($p < 0,05$) sehingga disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) maka peningkatan ekspresi caspase-9 akan semakin tinggi.

5.2.3 Apoptosis

5.2.3.1 Analisis Deskriptif Apoptosis

Dari hasil analisis deskriptif (lampiran 26) diketahui bahwa pemberian ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) pada konsentrasi 1100 $\mu\text{g/ml}$ ($\frac{1}{2} \times \text{IC}_{50}$) 2200 $\mu\text{g/ml}$ (IC_{50}), 4400 $\mu\text{g/ml}$ ($2 \times \text{IC}_{50}$) memiliki rata-rata indeks apoptosis yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan kontrol.

5.2.3.2 Uji Normalitas Apoptosis

Dari hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk* (lampiran 27), nilai signifikansi kontrol, setengah IC_{50} , IC_{50} dan $2x IC_{50}$ masing-masing adalah 0,233; 0,314; 0,506; dan 0,238. Dari semua data, nilai signifikan menunjukkan lebih dari 0,05 ($p > 0,05$) sehingga semua data terdistribusi normal.

5.2.3.3 Uji Homogenitas Apoptosis

Dari hasil uji homogenitas *Levene* (lampiran 28), nilai signifikansi data adalah 0,102. Nilai signifikan menunjukkan lebih dari 0,05 ($p > 0,05$) sehingga data memiliki varian yang sama (homogen).

5.2.3.4 Analisis Varian (ANOVA) Apoptosis

Dari hasil analisis varian ANOVA (lampiran 29), nilai signifikansi data adalah 0,000. Nilai signifikan menunjukkan kurang dari 0,05 ($p < 0,05$) sehingga konsentrasi ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) memiliki perbedaan signifikan pada apoptosis sel MCF-7.

5.2.3.5 Uji Post hoc Apoptosis

Uji *Post Hoc* digunakan untuk melihat konsentrasi mana yang memiliki perbedaan indeks apoptosis yang signifikan. Dari hasil uji *Post Hoc Tukey* (lampiran 30), diketahui pada semua data bahwa terdapat perbedaan indeks apoptosis yang signifikan antar konsentrasi ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) yang ditandai dengan nilai signifikan semua data kurang dari 0,05 ($p < 0,05$).

Tabel 5.6 Hasil Signifikansi Uji *Post Hoc* Apoptosis

	Kontrol	$\frac{1}{2} \times IC_{50}$	IC_{50}	$2 \times IC_{50}$
Kontrol	-	0,018	0,000	0,000
$\frac{1}{2} \times IC_{50}$	0,018	-	0,000	0,000
IC_{50}	0,000	0,000	-	0,000
$2 \times IC_{50}$	0,000	0,000	0,000	-

5.2.3.6 Uji Korelasi Apoptosis

Dari hasil uji korelasi *Pearson* (lampiran 31), didapatkan korelasi antara konsentrasi dan indeks apoptosis adalah 0,952, hal ini menunjukkan bahwa terjadi hubungan yang kuat antara konsentrasi dan apoptosis. Nilai signifikansi data adalah 0,000. Nilai signifikan menunjukan kurang dari 0,05 ($p < 0,05$) sehingga disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) maka peningkatan apoptosis akan semakin tinggi.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Analisa Hasil

6.1.1 Uji Fitokimia Ekstrak

Dalam ekstraksi daun kelor digunakan pelarut etanol dikarenakan berdasarkan penelitian yang dilakukan Shahriar *et al.* (2012) yang melakukan ekstraksi daun kelor (*M. oleifera*) menggunakan berbagai pelarut yakni metanol, etanol, pet-ether, kloroform, n-hexane dan air didapatkan hasil bahwa kandungan senyawa yang terdapat daun kelor (*M. oleifera*) paling banyak tersari pada penggunaan pelarut etanol. Pelarut etanol dapat mengekstraksi kandungan polifenol dibanding pelarut lainnya. Etanol lebih mudah berpenetrasi ke dalam membran seluler untuk mengekstraksi kandungan intraseluler dari tanaman. Digunakan etanol 70% karena didapatkan konsentrasi senyawa flavonoid yang lebih tinggi pada penggunaan etanol 70 % dibanding etanol murni (Tiwari, 2011). Sehingga ekstraksi daun kelor (*M. oleifera*) pada penelitian ini menggunakan pelarut etanol 70 %.

Dari hasil uji fitokimia, diketahui bahwa ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) mengandung tanin, alkaloid, fenol, saponin, flavonoid dan tidak mengandung terpenoid. Pada penelitian yang dilakukan oleh Okechukwu *et al.* (2013), kandungan fitokimia terbanyak yang terdapat pada ekstrak etanol daun kelor (*M. oleifera*) adalah flavonoid, kandungan alkaloid cukup banyak pada ekstrak dan kandungan tanin, saponin, terpenoid ditemukan relatif rendah dibanding zat aktif

lainnya. Pada penelitian tersebut Okechukwu *et al.* melakukan proses ekstraksi dengan metode maserasi yang direndam selama 48 jam dalam etanol absolut. Perbedaan waktu perendaman ekstrak dan konsentrasi etanol mungkin berperan dalam perbedaan zat aktif yang terkandung, selain itu asal tanaman yang berbeda juga mempengaruhi kandungan metabolitnya, sehingga terpenoid yang jumlahnya tidak terlalu banyak dalam kandungan ekstrak etanol daun kelor, pada penelitian ini tidak tersari.

6.1.2 Penentuan IC_{50} dengan MTT Assay

MTT (3 - [4,5-Dimethylthiazol-2-yl] -2,5 - diphenyltetrazolium bromida; thiazolyl biru) adalah garam tetrazolium yang larut dalam air yang jika dipaparkan dalam media akan menghasilkan larutan kekuningan. MTT yang terlarut akan dikonversi menjadi formazan ungu dengan pemutusan dari cincin tetrazolium oleh enzim dehidrogenase. Formazan tidak larut air dapat dilarutkan dengan menggunakan isopropanol atau pelarut lain dan bahan terlarut tersebut diukur secara spektrofotometri sehingga menghasilkan absorbansi sebagai konsentrasi zat warna yang dikonversi (Frel, 2011).

Dari beberapa penelitian terdahulu diketahui bahwa Inhibition concentration 50% (IC_{50}) ekstrak etanol daun kelor (*M. oleifera*) sebagai antioksidan adalah 62,09 $\mu\text{g/ml}$ (Shahriar, 2012). Pada kanker kolon IC_{50} ekstrak daun kelor pada *cell line* SW48, SW480, HCT masing-masing 102,40 $\mu\text{g/ml}$, 197,20 $\mu\text{g/ml}$, 264,83 $\mu\text{g/ml}$ (Pamok *et al.*, 2012). Pada kanker prostat (PC3) IC_{50} 105,47 $\mu\text{g/ml}$ dan kanker paru (CORL-23) IC_{50} 98,09 $\mu\text{g/ml}$ (Saetung *et al.*, 2005). Sedangkan ekstrak etanol daun kelor pada sel Hela $IC_{50} > 250 \mu\text{g/ml}$ (Hermawan *et al.*, 2012). Dikarenakan belum ada penelitian terdahulu mengenai IC_{50} daun

kelor (*M. oleifera*) pada sel MCF-7 maka dilakukan pencarian IC_{50} menggunakan MTT Assay dengan rentang dosis yang lebar, dosis yang digunakan terdiri dari seri dosis dan dosis kelipatan 50 pada percobaan MTT 1 dan dosis kelipatan 200 pada percobaan MTT 2.

Berdasarkan hasil MTT Assay, pada MTT 1 dengan dosis tertinggi 1000 $\mu\text{g/ml}$ belum ditemukan IC_{50} sehingga dilakukan percobaan dosis MTT 2 dengan dosis yang lebih tinggi hingga dosis 20000 $\mu\text{g/ml}$. Pada MTT 2 telah ditemukan IC_{50} daun kelor (*M. oleifera*) pada MCF-7 yakni 2200 $\mu\text{g/ml}$, IC_{50} yang didapatkan dari penelitian ini jauh berbeda dari IC_{50} sebelumnya, hal ini dikarenakan perbedaan jenis sel kanker yang digunakan. Dari uji *Spearman* diketahui bahwa ada hubungan yang kuat antara persen *hambatan proliferasi* dengan konsentrasi daun kelor (*M. oleifera*) yang digunakan dengan nilai koefisien korelasinya 0,881 dan $p < 0,01$, nilai koefisien korelasi bernilai positif sehingga disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi daun kelor (*M. oleifera*) maka semakin tinggi persen hambatan proliferasi sel MCF-7.

6.1.3 Pengaruh Ekstrak Daun Kelor (*M. oleifera*) terhadap Ekspresi Caspase-9 dan Apoptosis sel MCF-7

Pada kanker payudara terjadi penurunan atau hilangnya regulasi kematian sel (Indrati dkk, 2005). Untuk menghilangkan sel-sel yang abnormal maka sel mengalami apoptosis. Apoptosis merupakan cara kematian sel yang digunakan oleh organisme multi sel untuk membuang sel-sel yang tidak diinginkan (Taylor *et al.*, 2008). Pada apoptosis jalur intrinsik, *Cysteine aspartic protease-9* (caspase-9) memainkan peran sentral dalam mitokondria yang terlibat dalam banyak respon rangsangan apoptosis (Allan dan Paul, 2009). Sementara

itu, daun kelor (*M. oleifera*) merupakan tanaman yang tersebar di daerah tropis termasuk Indonesia yang memiliki khasiat sebagai agen anti kanker (Shahriar *et al.*, 2012; Berkovic *et al.*, 2013).

Tujuan dari penelitian ini adalah membuktikan bahwa ekstrak daun kelor dapat meningkatkan ekspresi caspase-9 dan meningkatkan apoptosis pada sel MCF-7. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa daun kelor (*M. oleifera*) mengandung quercetin, kaempferol dan benzil isotiosianat yang dapat meningkatkan aktivitas dari caspase-9 dan juga menginduksi apoptosis (Manguro and Lemmen, 2007; Miyoshi *et al.*, 2004; Sreelatha *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2006; Tiloke *et al.*, 2013). Quercetin mengaktifasi jalur mitokondria, pelepasan sitokrom c, aktivasi caspase-9, menghambat protein anti-apoptosis Bcl-2 dan mengaktifasi pro-apoptosis seperti Bax dan Bad (Granado-Serrano *et al.*, 2006).

Letak caspase-9 terutama ada pada sitosol, namun caspase-9 juga telah diamati berada pada mitokondria dan nukleus (Cecconi dan Di, 2007). Seperti halnya pada penelitian Costantini *et al.* (2002), pada proses induksi apoptosis, caspase-9 aktif menggunakan sel neuroblastoma dan sel hela, caspase-9 terdeteksi dalam sitosol (sitoplasma non-mitokondria) dan juga dalam nukleus. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilihat sel yang terekspresi caspase-9 pada sitosol dan nukleus.

Berdasarkan hasil imunositokimia Caspase-9, menunjukkan bahwa ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) pada dosis 1100 µg/ml ($1/2 \times IC_{50}$), 2200 µg/ml (IC_{50}), dan 4400 µg/ml ($2 \times IC_{50}$) berpengaruh secara signifikan meningkatkan ekspresi caspase-9 pada sel MCF-7 jika dibandingkan dengan kontrol yang ditunjukkan oleh hasil uji one way ANOVA ($p=0,000$). Hasil juga menunjukkan

bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) maka peningkatan ekspresi caspase-9 akan semakin tinggi.

Hasil apoptosis sel MCF-7 seharusnya pada masing-masing pengulangan pada setiap perlakuan terdiri dari 10 lapang pandang foto sel, namun dikarenakan keterbatasan jumlah sampel pada masing-masing pengulangan perlakuan hanya terdiri dari 2 lapang pandang foto sel saja, hal ini menyebabkan data hasil uji apoptosis kurang valid. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) pada dosis 1100 µg/ml ($1/2 \times IC_{50}$), 2200 µg/ml (IC_{50}), dan 4400 µg/ml ($2 \times IC_{50}$) berpengaruh secara signifikan meningkatkan apoptosis pada sel MCF-7 jika dibandingkan dengan kontrol yang ditunjukkan oleh hasil uji one way ANOVA ($p=0,000$). Hasil juga menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) maka peningkatan apoptosis akan semakin tinggi.

Apoptosis pada jalur intrinsik terjadi karena aktivasi caspase terutama diatur oleh kelompok protein Bcl-2 yang mendukung atau menghambat permeabilisasi membran luar mitokondria sehingga menyebabkan pelepasan sitokrom c dari ruang antar mitokondria ke sitosol (Shelton *et al.*, 2010). Dalam sitosol, sitokrom c mengaktifkan oligomerisasi dari *apoptotic peptide seactivating factor 1* (Apaf1), yang mengarah ke perekrutan dan aktivasi caspase-9 di apoptosome. Setelah diaktifkan, caspase-9 memotong dan mengaktifkan caspase efektor 3 dan 7, yang menargetkan regulasi dan struktural protein untuk proteolisis yang mempengaruhi kematian sel (Allan dan Paul, 2009).

6.2 Implikasi terhadap Bidang Farmasi

Dalam melakukan penelitian berbasis fitoterapi, farmasis harus lebih memperhatikan *ethnomedicine*, dalam penelitian ini penggunaan daun kelor (*M. oleifera*) sebagai agen terapi kanker mengacu pada *ethnomedicine* Ayurveda di India. Farmasis juga harus memahami metode ekstraksi, dalam penelitian ini menggunakan metode ekstraksi dingin yakni maserasi dengan pelarut etanol yang sesuai untuk menyari kandungan ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dan farmasis juga dapat menguji kandungan ekstrak secara kualitatif untuk membuktikan kebenaran pustaka yang ada. Selain itu untuk mengetahui mekanisme terapi obat dan jalur kerja obat di dalam tubuh maka farmasis juga harus mengembangkan penelitian ke arah biomolekuler, dalam penelitian ini dilakukan pembuktian peningkatan ekspresi caspase-9 yang merupakan salah satu jalur untuk apoptosis sel kanker payudara dan juga membuktikan bahwa daun kelor (*M. oleifera*) bisa menginduksi apoptosis kanker payudara.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan pada penelitian ini adalah tidak dilakukannya analisis uji kuantitatif ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dan juga tidak dilakukan perbandingan efek ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dengan obat konvensional kanker payudara, hal tersebut tidak dilakukan karena keterbatasan waktu dan biaya.

BAB 7

KESIMPULAN dan SARAN

7.1. Kesimpulan

- 1) Inhibition Concentration 50 % (IC_{50}) daun kelor (*M. oleifera*) pada sel MCF-7 adalah 2200 $\mu\text{g/ml}$
- 2) Ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) pada kelompok perlakuan pada konsentrasi 1100 $\mu\text{g/ml}$ ($1/2 \times IC_{50}$), 2200 $\mu\text{g/ml}$ (IC_{50}) dan 4400 $\mu\text{g/ml}$ ($2 \times IC_{50}$) berpengaruh secara signifikan meningkatkan ekspresi caspase-9 pada sel MCF-7. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) maka ekspresi caspase-9 akan semakin tinggi.
- 3) Ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) pada kelompok perlakuan pada konsentrasi 1100 $\mu\text{g/ml}$ ($1/2 \times IC_{50}$), 2200 $\mu\text{g/ml}$ (IC_{50}) dan 4400 $\mu\text{g/ml}$ ($2 \times IC_{50}$) cenderung berpengaruh secara signifikan meningkatkan apoptosis pada sel MCF-7. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) maka apoptosis akan semakin tinggi.

7.2. Saran

- 1) Perlu penelitian lebih lanjut mengenai uji kuantitatif ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) sehingga dapat diketahui masing-masing kadar kandungan zat aktif yang terdapat dalam ekstrak.
- 2) Perlu penelitian lebih lanjut mengenai uji toksisitas ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) pada sel normal

- 3) Perlu penelitian lebih lanjut mengenai perbandingan efek dari ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dibandingkan dengan obat kanker payudara konvensional
- 4) Perlu penelitian lebih lanjut mengenai efek ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) secara *in vivo*.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR PUSTAKA

- Allan, L. dan Paul, C.. Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. *FEBS Journal*, 2009, (276): 6063–6073.
- Anwar, F., Sajid L., Muhammad A. dan Anwarul H.G. *Moringa oleifera*: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses (Review Article). Wiley InterScience, 2006
- American Cancer Society. 2013. Cancer Fact and Figures 2013. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-036845.pdf>
- Balachandran, P. dan Rajgopal G. Cancer—an ayurvedic perspective. *Pharmacological Research*, 2005, (51): 19–30
- Berkovich, L, Gideon E., Ilan R., Adam R., Akiva V., Shahrar L. Moringa Oleifera aqueous leaf extract down-regulates nuclear factor-kappaB and increases cytotoxic effect of chemotherapy in pancreatic cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2013, (13): 212
- Brashers, V. L. 2007. *Aplikasi Klinis Patofisiologi: Pemeriksaan & Manajemen*, Jakarta, Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Budda, S., Chaniphun B., Siriporn T., Anudep R., Supradit W., Jeong S.L., et al. Suppressive Effects of *Moringa oleifera* Lam Pod Against Mouse Colon Carcinogenesis Induced by Azoxymethane and Dextran Sodium Sulfate. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2011, (12)
- Burry, R.W. Controls for Immunocytochemistry: An Update. *Journal Histochem cytochem*, 2011, (1): 6-12
- Chilshom-Burn M.A., Wells B.G., Schwinghammer T.L., Malone P.M., Kolesar J.M., Rotschafer J.M., Dipiro J.T. 2008. *Pharmacotherapy Principle and Practices*, New York: McGraw-Hill
- Cecconi, F dan Di Bartolomeo. S CASP-9 (caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, 2007;11(2):90-92.
- Costantini, J-M Bruey, Castedo, Métivier, Loeffler, S A Susin, et al. Pre-processed caspase-9 contained in mitochondria participates in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 2002, (9): 82-88
- DeSantis, C., Jiemin M., Leah B., Ahmedin J. Breast Cancer Statistics, 2013. *Ca Cancer J Clin*, 2013, (00)
- Dipiro J., Robert L., Gary C. Y., Gary R. M., Barbara G. W., Michael P. 2008, *Pharmacotherapy A Patophysilogic Approach. Seventh Edition*, New York: The McGraw-Hill Companies
- Fahey, J. W. *Moringa oleifera*: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties. Part 1. *Trees for Life Journal*, 2005, (1): 5
- Farooq, F., Meenu R., Avinash T., Abdul A.K. dan Shaila F. Medicinal properties of *Moringa oleifera*: An overview of promising healer. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2012, (6): 4368-4374
- Frel, M. Cell Viability and Proliferation. *Biofels Sigma*, 2011, (6)
- Globocon, 2008. *Breast Cancer incidence in Indonesia*. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/breast.asp>

- Granado-Serrano, Ana B., Mari'a A.M., Laura B., Luis G., and Sonia R. Quercetin Induces Apoptosis via Caspase Activation, Regulation of Bcl-2, and Inhibition of PI-3-Kinase/Akt and ERK Pathways in a Human Hepatoma Cell Line (HepG2)1. *The Journal of Nutrition Biochemical, Molecular, and Genetic Mechanisms*, 2006, (136): 2715–2721
- Hermawan, A., Kholid A.N., Sarmoko, Dyaningtyas D., Pamungkas P., Edy M. Ethanol extract of *Moringa oleifera* increased cytotoxic effect of doxorubicin on HeLa cancer cells. *Journal of Natural Remedies*, 2012, (12): 108–114
- Indrati, R., Henry S., Djoko H. *Faktor-Faktor Risiko yang Berpengaruh terhadap Kejadian Kanker Payudara Wanita*. *Jurnal Epidemiologi UNDIP*, 2005
- Jenie R.I dan Edy M. Aplikasi Ko-kemoterapi Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanolik Daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) pada Sel Kanker Payudara MCF-7.M. *Ilmu Kefarmasian*, 2009, (6): 132 – 141
- Kanagasabai R, Karthikeyan K, Vedam K, Qien W, Zhu Q, dan Ilangovan G. Hsp27 Protects Adenocarcinoma Cells from UV-Induced Apoptosis by Akt and p21-Dependent Pathways of Survival. *Molecular Cancer Research*, 2010, (10)
- Khiong, K., Adhika O. A., Chakravitha M. Inflammation, Immunity, and Cancer: The Role of Transcription Factors NF- κ B and STAT3. *M. Kedokteran Indonesia*, 2010
- Manguro and Lemmen. Phenolics of *Moringa oleifera* leaves. *Natural Product Research*, 2007, (21): 56 – 68.
- Maritha, I. D., Supranowo, Diana L. Ekspresi Cytosolic Aspartate-Specific Cysteine Protease-3 (Caspase-3) pada Jaringan Hati *Rattus Norvegicus* (Wistar) Setelah Pemberian Subkronik Aflatoxin B1 (AFB1). *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 2006, (22)
- Miyoshi, N., Koji U., Toshihiko O., Yoshimasa N. A Link between Benzyl Isothiocyanate-Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis: Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinases in the Bcl-2 Phosphorylation. *Cancer Research*, 2004, (64): 2134–2142
- Nazir, M. 2004. *Metode Penelitian*. Jakarta: Ghalia Indonesia.
- NCI. 2013. Breast Cancer. <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast>
- NHMRC. 2001. Clinical Practice Guidelines Management of Early Breast Cancer, Second Edition, Australia : NHMRC.
- O'Dea E. dan Alexander H. 2009. NF κ B Signaling. *WIREs Syst Biol Med* 2009 1 107–115
- Oh, S.M., Kim YP, Chung KH. Biphasic effects of kaempferol on the estrogenicity in human breast cancer cells. *Arch Pharm Res.*, 2006, (26): 354–62.
- Okechukwu, U., Nwodo O., Joshua P., Bawa A., Ossai E., Odo C. E. Phytochemical and Acute Toxicity Studies of *Moringa Oleifera* Ethanol Leaf Extract. *International Journal of Live Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 2013, (2).
- Ollson and B Zhivotovsky. Cell Death and Differentiation: Caspases and Cancer, *Genetic and Medicine*, 2011, (18): 1441–1449
- Paliwal, R., Veena S. dan Pracheta. A Review on Horse Radish Tree (*Moringa oleifera*): A Multipurpose Tree with High Economic and Commercial Importance. *Asian Journal of Biotechnology*, 2011, (4): 317–328

- Pamok, S., Supap S., Usanee V. dan Kanokporn S. Antiproliferative Effect of *Moringa oleifera* Lam. And *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk Extracts on The Colon Cancer Cells. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2012, (6): 139-145
- Parvathy, M.V.S. dan Umamaheshwar. Cytotoxic Effect of *Moringa Oleifera* Leaf Extracts on Human Multiple Myeloma Cell Lines. *Trends in Medical Research*, 2007, (2): 44-50
- Price, M. 2007. *The Moringa Tree*, USA, ECHO Technical Note.
- Prunet, C., Lemaire-ewing S., Menetrier F., Neel D., dan Lizard. Activation of Caspase-3 Dependent and Independent Pathway during 7-Ketocholesterol and 7 β -hidroxycholesterol Induced Cell Death : A Morphological and Biochemical Study. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2005, (5): 311-326.
- Putra, A. dan Tjahjono, W. Efektivitas Ekstrak Umbi *Typhonium flagelliforme* Fraksi Diklorometanolik dalam Menghambat Proliferasi Sel MCF-7 Kanker Payudara. *Journal Indonesia Medical Association*, 2012, (62)
- Rerole A.L, Joly A.L, Thuringer D, dan Garrido C. Hsp70 and Hsp27 : Emerging Targets in Cancer Therapy. *Apoptosome : An up-and-coming Therapeutical Tool*
- Romadhon, Y.A. Gangguan Siklus Sel dan Mutasi Gen pada Kanker Payudara. *CDK-209*, 2013, (10)
- Saetung, A., Arunporn I., Chawaboon D., Chatchai W., Niwat K., Pranee R. Cytotoxic activity of Thai medicinal plants for cancer treatment. *Songklanakar J. Sci. Technol.*, 2005, (27): 469-478
- Shahriar., M., Md. Ismail H., Abu N., Sadika A., Md. Aminul H. dan Mohiuddin A. Preliminary Phytochemical Screening, *In-Vitro* Antioxidant and Cytotoxic Activity of Five Different Extracts of *Moringa Oleifera* Leaf. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2012, (05): 65-68
- Shelton S., Cindy D., Dillard, John D.R. Activation of Caspase-9, but Not Caspase-2 or Caspase-8, Is Essential for Heat-induced. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, (206): 40525-40533
- Siegel R., Carol D., Katherine V., Kevin S., Angela M., Tenbroeck S., et al. Cancer treatment and survivorship statistics. *CA Cancer J Clin.*, 2012, (5): 348.
- Sreelatha, S.,A. Jeyachitra, P.R. Padma. Antiproliferation and induction of apoptosis by *Moringa oleifera* leaf extract on human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, (49): 1270–1275
- Taylor, R. C., Sean P. Cullen and Seamus J. M. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Publishing Group*, 2008, (9)
- Tiloke, C., Alisa P. and Anil A. C. The antiproliferative effect of *Moringa oleifera* crude aqueous leaf extract on cancerous human alveolar epithelial cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2013, (13): 226
- Tiwari,P., Bimlesh K., Mandeep K., Harleen K. Phytochemical Screening and Extraction: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2008 (3): 1089-1099
- Tjay, T.H dan Kirana R. 2008. *Obat-obat penting edisi keenam*. jakarta. Penerbit PT Alex Media Komputindo
- Wang E.L, Qian Z.R., Nakasono M, Tanahashi T, Yoshimoto K, Bando Y, et al. High Expression of Toll-like Receptor 4/myeloid Differentiation Factor 88

Signals Correlates with Poor Prognosis in Colorectal Cancer. *Br J Cancer*, 2010, (5): 908-915

Widowati, L. dan Harfia M.. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 50% Umbi Keladi Tikus (Typhonium Flagelliforme (LOOD)BI) terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 In Vitro. *Media Litbang Kesehatan*, 2009, (19)

Wu, S. H., Hang L., Yang J., Chen H., Lin H., Chiang J., et al. Curcumin Induces Apoptosis in Human Non-small Cell Lung Cancer NCI-H460 Cells through ER Stress and Caspase Cascade- and Mitochondria-dependent Pathways. *Anticancer Research*, 2010. (30):2125-2134

Zampieri L., Bianchi P., Ruff P., Arbuthnot P. Differential Modulation by Estradiol of P-glycoprotein Drug Resistance Protein Expression in Culture MCF-7 and T47D Breast Cancer Cells. *Anticancer Res.*, 2002, (4): 2253

Zhang, Z., Kiichiro T., Hiroshi E., Sanetaka S. Fucoidan Extract Induces Apoptosis in MCF-7 Cell Via a Mechanism Involving the ROS-dependent JNK Activation and Mitochondria-Mediated Pathway. *Plos One*, 2011, (11): 1371



LAMPIRAN**Lampiran 1. Pernyataan Keaslian Tulisan****PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Abni Rachmi Nopitasari

NIM : 105070500111037

Program Studi : Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya tulis saya sendiri. Saya mengakui bahwa tulisan ini mendapat ide dari penelitian-penelitian yang sebelumnya dilakukan peneliti lain. Namun, saya menegaskan bahwa Tugas Akhir yang saya buat ini bukan merupakan hasil pengambilan semua gagasan atau pikiran orang lain. Apabila dikemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, Juni 2014

Yang Membuat Pernyataan

Abni Rachmi Nopitasari

105070500111037

Lampiran 2. Keterangan Kelaikan Etik

KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
THE MINISTRY OF EDUCATION AND CULTURE
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FACULTY OF MEDICINE UNIVERSITY OF BRAWIJAYA
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE
Jalan Veteran, Malang – 65145
Telp / Fax. (62) 341 - 553930

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 200 / EC / KEPK – S1 – FARM / 03 / 2014

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

JUDUL : Efek Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap Perubahan Ekspresi *Cystein Protease-9* (Caspase-9) Aktif pada Apoptosis *Cell-Line* Kanker Payudara MCF-7

PENELITI UTAMA : Abni Rachmi Nopitasari

UNIT / LEMBAGA : Farmasi Klinis

TEMPAT PENELITIAN : Laboratorium Bahan Alam, Program Studi Farmasi Universitas Brawijaya, Laboratorium Pengujian dan Penelitian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Malang, 13 MAR 2014

An Ketua,
Koordinator Divisi I

Prof. Dr. dr Teguh W. Sardjono, DTM&H, MSc, SpPark
NIP. 19520410/198002 1 001

Catatan :
Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol)

Lampiran 3. Determinasi Daun Kelor (*M. oleifera*)

**DINAS KESEHATAN PROPINSI JAWA TIMUR**
UPT MATERIA MEDICA
Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396 Batu (65313)
KOTA BATU

Nomor : 074 / 052 / 101.8 / 2014
Sifat : Biasa
Perihal : Determinasi Tanaman KELOR

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : ABNI RACHMI (105070500111037)
ERITA RAHMANI (105070500111017)
INDAH LESTARI (105070500111015)
NABILA-ANDJANI (105070500111006)
RISKA ROSIDA (105070501111011)

Fakultas : Program Studi Farmasi
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

1. Perihal determinasi tanaman Kelor
Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas : Dicotyledonae
Sub kelas : Dilleniidae
Bangsa : Capparales
Suku : Moringaceae
Marga : Moringa
Jenis : Moringa oleifera, Lamk.
Sinonim : Moringa pterygosperma Gaertn. N. W.
Kelor (Indonesia, Jawa, Sunda, Bali, Lampung), Kerol (Buru); Marangghi (Madura), Moltong (Flores), Kelo (Gorontalo); Keloro (Bugis), Kawano (Sumba), Ongge (Bima); Hau fo (Timor).

Kunci determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15b-197b-208b-209b-210b-211b-214a-1

2. Morfologi : Habitus Pohon, tinggi + 8 m. Batang Berkayu, bulat, bercabang, berbintik hitam, putihkotor. Daun Majemuk, panjang 20-60 cm, anak daun bulat telur, tepi rata, ujung berlekuk, menyirip ganjil, hijau. Bunga Majemuk, bentuk malai, letak di ketiak daun, panjang 10-30 cm. Daun kelopak hijau, benang sari dan putik kecil, mahkota putih, putih. Buah Polong, panjang 20-45 cm, berisi 15-25 biji, coklat kehitaman. Biji Bulat, bersayap tiga, hitam. Akar Tunggang, putih kotor.

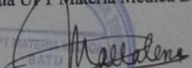
3. Nama Simplesia : Moringae Folium / Daun kelor

4. Kandungan kimia : Akar: saponin, polifenol, zat pahit, getir dan pedas. Daun: saponin, polifenol dan minyak atsiri. Kulit batang saponin polifenol dan alkaloid. Biji: minyak dan lemak.

5. Penggunaan : Penelitian

6. Daftar Pustaka :
- Anonim, /http. www.iptek.net.id/ kelor . Diakses tanggal 22 Oktober 2010
- Anonim, /http. www.plantamor.id/ kelor . Diakses tanggal 11 Desember 2010
- Anonim, /http. www.warintek.ristek.com/ kelor . Diakses tanggal 4 Oktober 2006
- Steenis, CGGJ Van Dr. FLORA, 2008, Pradnya Paramita , Jakarta
- Syamsuhidayat, Sri sugati, Hutapea, Johny Ria. 1991. Inventaris Tanaman Obat Indonesia I. Departemen Kesehatan Republik Indonesia : Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan

Demikian determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 25 FEBRUARI 2014
Kepala UPT Materia Medica Batu

Drs. Husla RMA, Apt. MKes.
NIP.19611102 199103 1 003

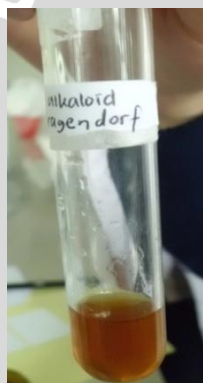
Lampiran 4. Hasil Pengamatan Uji Fitokimia

1. Uji Kandungan Tanin



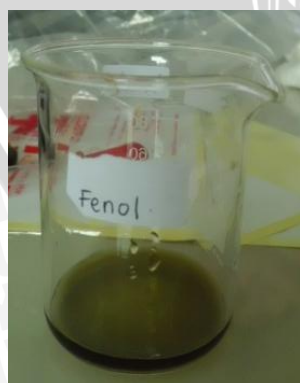
Warna hijau kehitaman pada ekstrak setelah diberi reagen FeCl_3 menunjukkan adanya kandungan tanin yang terdapat pada ekstrak daun kelor (*M. oleifera*).

2. Uji Kandungan Alkaloid



Warna oranye kecoklatan pada ekstrak setelah diberi reagen dragendorff menunjukkan adanya kandungan alkaloid yang terdapat pada ekstrak daun kelor (*M. oleifera*).

3. Uji Kandungan Fenol



Warna hijau kehitaman pada ekstrak setelah diberi aquades dan reagen FeCl_3 5% menunjukkan adanya kandungan fenol yang terdapat pada ekstrak daun kelor (*M. oleifera*).

4. Uji Kandungan Saponin



Terbentuk lapisan busa yang tebal dan stabil (tidak mudah hilang) selama 30 menit pada ekstrak setelah diberi aquades dan dikocok menunjukkan adanya kandungan saponin yang terdapat pada ekstrak daun kelor (*M. oleifera*).

5. Uji Kandungan Flavonoid



Setelah diberi NaOH, ekstrak berwarna kuning pekat, lalu ketika diberi HCl terbentuk warna kuning yang tidak lebih pekat dari sebelumnya menunjukkan adanya kandungan flavonoid yang terdapat pada ekstrak daun kelor (*M. oleifera*).

6. Uji Kandungan Terpenoid



Tidak terbentuknya warna coklat kemerahan pada permukaan larutan ekstrak setelah diberi kloroform dan H_2SO_4 pekat pada ekstrak menunjukkan tidak adanya kandungan terpenoid yang terdapat pada ekstrak daun kelor (*M. oleifera*).

Lampiran 5. Hasil Pembacaan Absorbansi MTT Assay 1

	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3	Pengulangan 4
kontrol	0,73	0,717	0,753	0,721
1000	0,455	0,435	0,413	0,466
500	0,462	0,449	0,454	0,462
250	0,479	0,529	0,533	0,538
125	0,442	0,504	0,512	0,508
62,5	0,444	0,456	0,49	0,502
31,25	0,484	0,492	0,509	0,502
15,625	0,475	0,486	0,512	0,495
7,8125	0,469	0,441	0,487	0,504
700	0,502	0,504	0,517	0,54
650	0,49	0,505	0,537	0,51
600	0,539	0,481	0,499	0,536
550	0,537	0,582	0,572	0,566
500	0,536	0,576	0,603	0,577
450	0,578	0,586	0,56	0,588
400	0,569	0,571	0,574	0,55
350	0,537	0,582	0,599	0,588
300	0,599	0,558	0,537	0,522
250	0,602	0,563	0,585	0,532
200	0,582	0,58	0,588	0,548
150	0,601	0,648	0,608	0,575
100	0,61	0,642	0,638	0,611
50	0,582	0,649	0,632	0,609

Lampiran 6. Perhitungan Penentuan IC₅₀ MTT 1

$$\text{Persen hambatan proliferasi} = \frac{\text{optical density kontrol sel} - \text{optical density perlakuan}}{\text{optical density kontrol sel}} \times 100\%$$

$$1. \quad 1000 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,730 - 0,442}{0,730} \times 100\% = 39,45 \%$$

$$2. \quad 500 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,730 - 0,457}{0,730} \times 100\% = 37,40 \%$$

$$3. \quad 250 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,730 - 0,520}{0,730} \times 100\% = 28,77 \%$$

$$4. \quad 125 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,730-0,500}{0,730} \times 100\% = 31,50 \%$$

$$5. \quad 62,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,730-0,473}{0,730} \times 100\% = 35,20 \%$$

$$6. \quad 31,25 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,730-0,497}{0,730} \times 100\% = 31,92 \%$$

$$7. \quad 15,625 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,730-0,492}{0,730} \times 100\% = 32,60 \%$$

$$8. \quad 7,8125 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,730-0,475}{0,730} \times 100\% = 34,93 \%$$

$$9. \quad 700 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,730-0,516}{0,730} \times 100\% = 29,32 \%$$

$$10. \quad 650 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,730-0,511}{0,730} \times 100\% = 30 \%$$

$$11. \quad 600 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,730-0,514}{0,730} \times 100\% = 29,59 \%$$

$$12. \quad 550 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,730-0,569}{0,730} \times 100\% = 22,74 \%$$

$$13. \quad 500 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,730-0,573}{0,730} \times 100\% = 21,51 \%$$

$$14. \quad 450 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,730-0,578}{0,730} \times 100\% = 20,82 \%$$

$$15. \quad 400 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,730-0,566}{0,730} \times 100\% = 22,47 \%$$

$$16. \quad 350 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,730-0,577}{0,730} \times 100\% = 21,03 \%$$

$$17. \quad 300 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,730-0,554}{0,730} \times 100\% = 24,11 \%$$

$$18. \quad 250 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,730-0,570}{0,730} \times 100\% = 21,85 \%$$

$$19. \quad 200 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,730-0,574}{0,730} \times 100\% = 21,30 \%$$

$$20. \quad 150 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,730-0,608}{0,730} \times 100\% = 16,71 \%$$

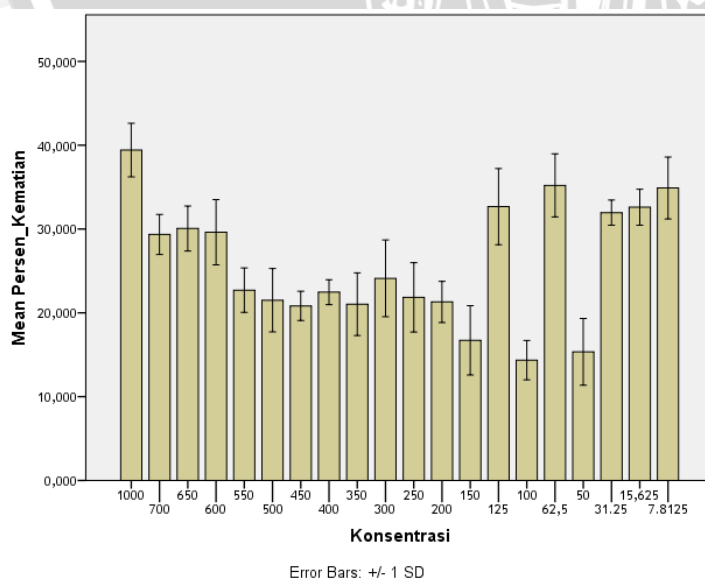
$$21. \quad 100 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,730-0,623}{0,730} \times 100\% = 14,62\%$$

$$22. \quad 50 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,730-0,610}{0,730} \times 100\% = 15,34 \%$$

Lampiran 7. Persentase Hambatan Proliferasi sel MCF-7

Konsentrasi (µg/µl)	Persen Hambatan Proliferasi (%)	Standar Deviasi
1000	39,439	4,177
700	29,374	2,925
650	30,092	1,888
600	29,647	4,297
550	22,732	3,276
500	21,534	3,364
450	20,849	3,429
400	22,492	1,619
350	21,054	3,702
300	24,136	4,995
250	21,876	3,560
200	21,328	2,121
150	16,741	4,836
125	32,694	4,655
100	14,379	2,656
62,5	35,228	3,680
50	15,371	4,442
31,25	31,975	1,422
15,625	32,626	1,582
7,8125	34,920	3,507

Lampiran 8. Grafik Rata-Rata Indeks Hambatan Proliferasi MCF-7 MTT 1



Lampiran 9. Hasil Pembacaan Absorbansi MTT Assay 2

	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3
Kontrol	0,936	0,85	0,781
20000	0,209	0,204	0,2
10000	0,178	0,174	0,17
5000	0,216	0,223	0,201
2500	0,372	0,379	0,372
1250	0,521	0,535	0,536
1200	0,562	0,563	0,568
1400	0,543	0,574	0,513
1600	0,375	0,472	0,343
1800	0,412	0,401	0,379
2000	0,369	0,36	0,375
2200	0,397	0,39	0,416
2400	0,412	0,392	0,399
2600	0,365	0,327	0,323
2800	0,287	0,312	0,317
3000	0,311	0,304	0,302
3200	0,31	0,292	0,314
3400	0,276	0,296	0,297
3600	0,311	0,318	0,33
3800	0,282	0,294	0,306
4000	0,232	0,247	0,247
4200	0,2	0,198	0,162
4400	0,189	0,167	0,158
4600	0,173	0,155	0,155
4800	0,16	0,156	0,152
5200	0,17	0,166	0,167
5400	0,171	0,164	0,158
5600	0,185	0,182	0,179
5800	0,204	0,203	0,2
6000	0,2	0,196	0,182
6200	0,202	0,19	0,173

Lampiran 10. Perhitungan Penentuan IC₅₀ MTT 2

$$\text{Persen Kematian} = \frac{\text{optical density kontrol sel} - \text{optical density perlakuan}}{\text{optical density kontrol sel}} \times 100\%$$

1. 20.000 µg/µl = $\frac{0,816 - 0,204}{0,816} \times 100\% = 75 \%$
2. 10.000 µg/µl = $\frac{0,816 - 0,213}{0,816} \times 100\% = 78,68 \%$
3. 6200 µg/µl = $\frac{0,816 - 0,193}{0,816} \times 100\% = 76,35 \%$
4. 6000 µg/µl = $\frac{0,816 - 0,193}{0,816} \times 100\% = 76,35 \%$
5. 5800 µg/µl = $\frac{0,816 - 0,202}{0,816} \times 100\% = 75,25 \%$
6. 5600 µg/µl = $\frac{0,816 - 0,182}{0,816} \times 100\% = 77,70 \%$
7. 5400 µg/µl = $\frac{0,816 - 0,164}{0,816} \times 100\% = 79,90 \%$
8. 5200 µg/µl = $\frac{0,816 - 0,168}{0,816} \times 100\% = 79,40 \%$
9. 5000 µg/µl = $\frac{0,816 - 0,213}{0,816} \times 100\% = 73,90\%$
10. 4800 µg/µl = $\frac{0,816 - 0,156}{0,816} \times 100\% = 80,90 \%$
11. 4600 µg/µl = $\frac{0,816 - 0,161}{0,816} \times 100\% = 80,30 \%$
12. 4400 µg/µl = $\frac{0,816 - 0,171}{0,816} \times 100\% = 79,04 \%$
13. 4200 µg/µl = $\frac{0,816 - 0,187}{0,816} \times 100\% = 77,07 \%$
14. 4000 µg/µl = $\frac{0,816 - 0,242}{0,816} \times 100\% = 70,30 \%$
15. 3800 µg/µl = $\frac{0,816 - 0,294}{0,816} \times 100\% = 63,97 \%$
16. 3600 µg/µl = $\frac{0,816 - 0,320}{0,816} \times 100\% = 60,78 \%$

$$17. 3400 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,816-0,290}{0,816} \times 100\% = 64,50 \%$$

$$18. 3200 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,816-0,305}{0,816} \times 100\% = 62,62 \%$$

$$19. 3000 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,816-0,306}{0,816} \times 100\% = 62,50 \%$$

$$20. 2800 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,816-0,305}{0,816} \times 100\% = 62,62 \%$$

$$21. 2600 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,816-0,338}{0,816} \times 100\% = 58,58 \%$$

$$22. 2500 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,816-0,374}{0,816} \times 100\% = 54,17 \%$$

$$23. 2400 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,816-0,401}{0,816} \times 100\% = 50,86 \%$$

$$24. 2200 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,816-0,368}{0,816} \times 100\% = 54,90 \%$$

$$25. 2000 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,816-0,368}{0,816} \times 100\% = 54,90 \%$$

$$26. 1800 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,816-0,397}{0,816} \times 100\% = 51,34 \%$$

$$27. 1600 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,816-0,397}{0,816} \times 100\% = 51,34 \%$$

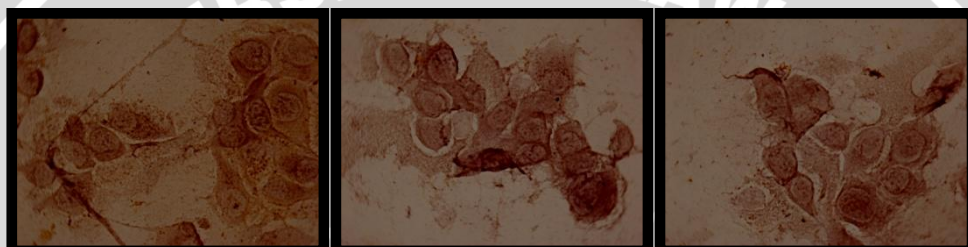
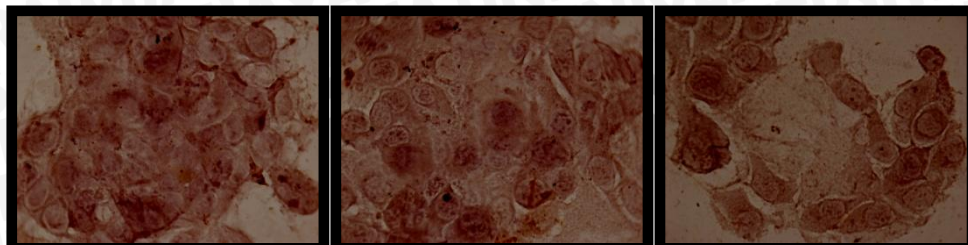
$$28. 1400 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,816-0,543}{0,816} \times 100\% = 33,46 \%$$

$$29. 1250 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,816-0,531}{0,816} \times 100\% = 34,93 \%$$

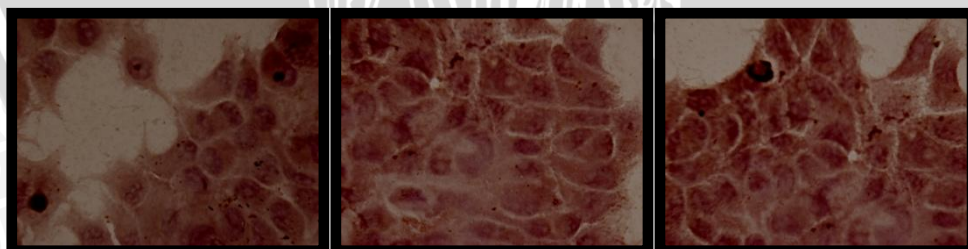
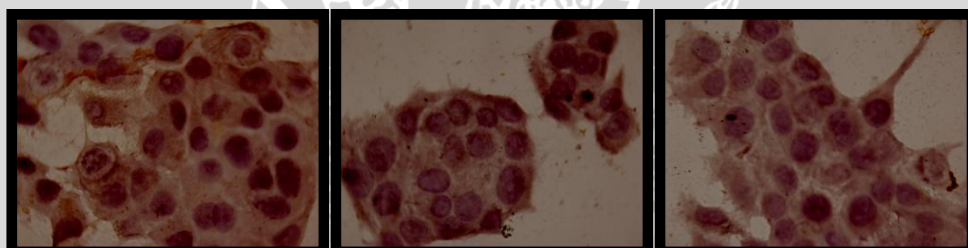
$$30. 1200 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{0,816-0,564}{0,816} \times 100\% = 30,88\%$$

Lampiran 11. Penampakan Sel setelah imunositokimia Caspase-9

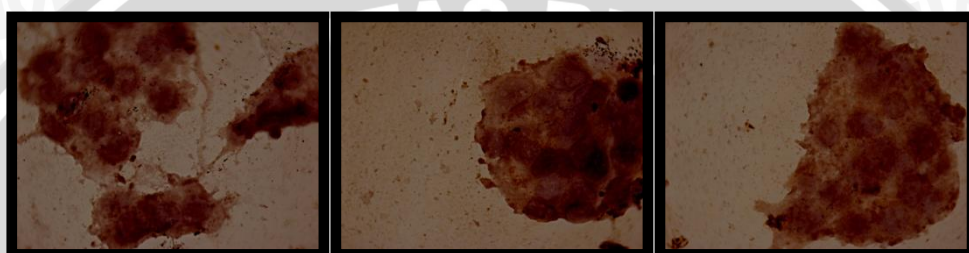
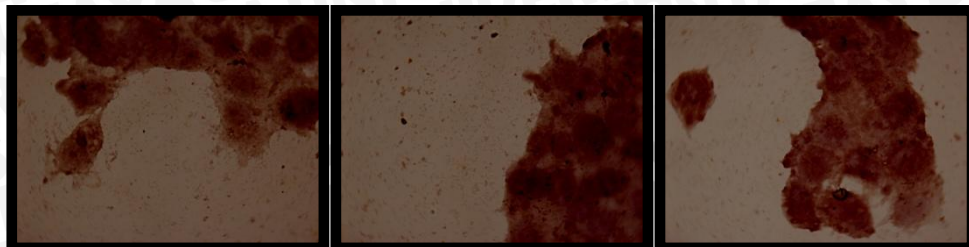
1. Kontrol



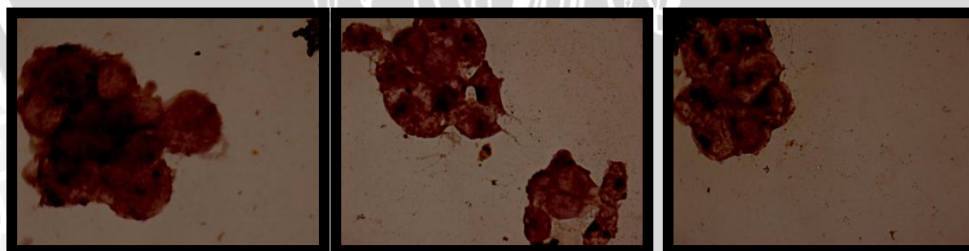
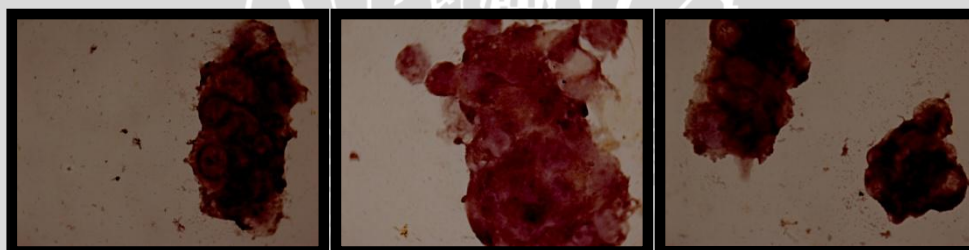
2. Setengah IC₅₀



3. IC_{50}



4. $2 \times IC_{50}$

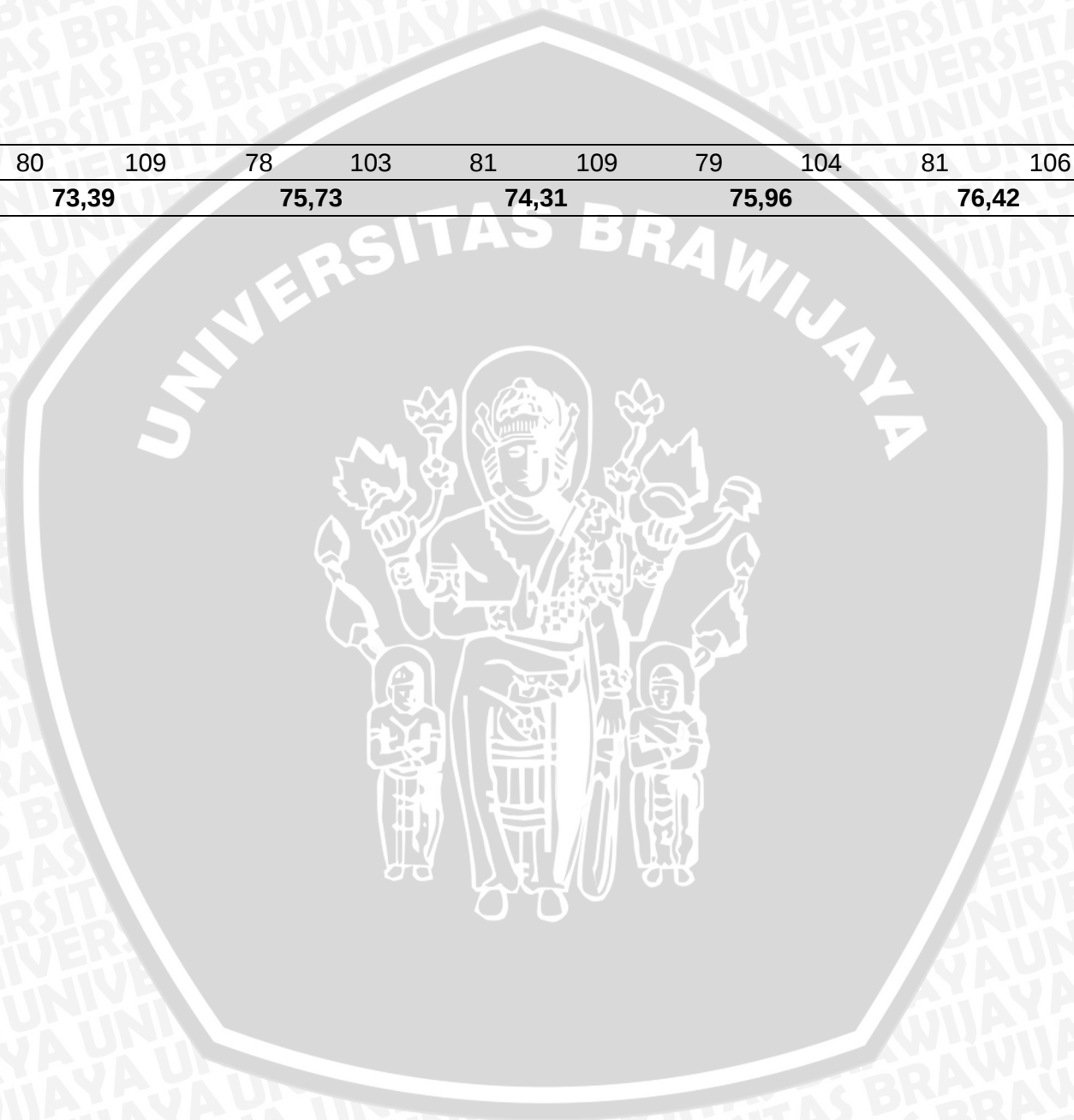


Lampiran 12. Hasil Perhitungan Indeks Ekspresi Caspase-9

Perlakuan	Lapang	Replikasi 1		Replikasi 2		Replikasi 3		Replikasi 4		Replikasi 5		Replikasi 6	
	Pandang	Caspase-9	Total Sel	Caspase-9	Total Sel	Caspase-9	Total Sel	Caspase-9	Total Sel	Caspase-9	Total Sel	Caspase-9	Total Sel
Kontrol	1	1	19	3	9	1	7	1	17	3	12	6	18
	2	4	21	3	17	1	33	2	7	0	30	1	13
	3	0	6	7	10	10	12	2	39	4	12	2	25
	4	1	10	1	8	5	24	4	14	3	20	3	18
	5	0	9	2	6	0	28	4	7	0	9	5	11
	6	15	20	1	21	1	7	2	9	1	11	3	10
	7	1	11	2	6	4	12	3	11	4	6	3	13
	8	2	9	0	29	1	11	4	20	4	23	1	7
	9	0	13	5	29	4	17	2	17	4	16	2	17
	10	1	16	3	9	3	9	2	6	6	14	0	11
Total		25	134	27	144	30	160	26	147	29	153	26	143
Indeks		18,66		18,75		18,75		17,69		18,95		18,18	
1/2 x IC50	1	8	36	12	31	1	12	9	29	4	24	5	34
	2	5	32	2	7	3	22	3	14	4	43	8	26
	3	5	26	1	15	2	14	11	28	7	27	2	28
	4	13	27	0	21	7	20	4	15	5	27	7	23
	5	0	27	3	40	6	15	7	30	1	31	4	11
	6	1	54	7	14	3	15	13	54	4	19	4	35
	7	5	22	5	30	7	31	8	44	6	31	10	34
	8	3	30	3	31	3	12	6	42	17	36	3	21
	9	11	28	10	14	2	20	9	34	2	22	12	31

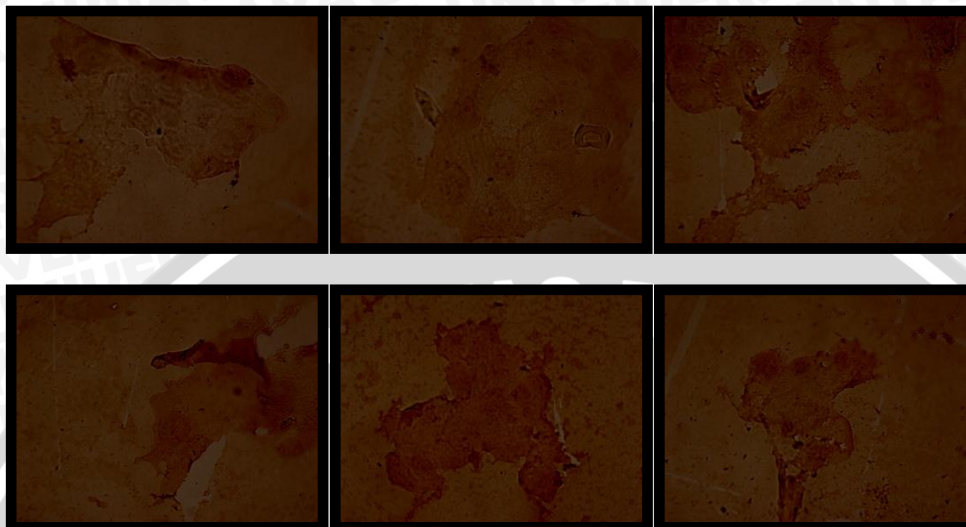
IC50	10	18	31	12	28	3	12	0	18	9	14	3	21
	Total	69	313	55	231	37	173	70	308	59	274	58	264
	Indeks	22,04	23,81	21,39	22,73	21,53	21,97						
	1	11	15	17	26	6	16	4	22	10	27	1	38
	2	8	14	1	17	13	13	7	22	8	20	17	19
	3	3	20	1	49	7	16	9	23	4	31	4	35
	4	10	21	16	16	5	16	18	18	1	21	10	41
	5	6	15	3	23	5	21	3	28	12	24	3	25
	6	10	14	6	47	11	26	9	32	0	24	5	26
	7	3	36	4	39	0	29	4	32	6	24	15	17
	8	5	41	22	27	8	17	10	19	23	23	2	18
	9	8	40	15	32	6	18	4	22	8	13	15	31
	10	11	17	11	11	6	22	8	23	2	19	15	16
	Total	75	233	96	287	67	194	76	241	74	226	87	266
	Indeks	32,19	33,45	34,54	31,54	32,74	32,71						
2 x IC50	1	8	9	7	7	4	4	10	10	4	4	7	12
	2	6	7	10	10	16	20	15	19	10	16	4	5
	3	2	6	3	5	2	5	8	19	3	9	11	11
	4	3	3	6	12	6	12	3	4	9	11	8	8
	5	16	29	9	9	14	14	8	15	8	8	5	6
	6	4	6	2	2	6	6	1	2	11	11	5	20
	7	8	9	10	15	8	17	7	7	5	11	17	19
	8	7	7	7	12	9	13	11	12	10	10	5	5
	9	15	22	10	13	5	5	7	7	15	15	10	10
	10	11	11	14	18	11	13	9	9	6	11	4	4

Total	80	109	78	103	81	109	79	104	81	106	76	100
Indeks	73,39		75,73		74,31		75,96		76,42		76,00	

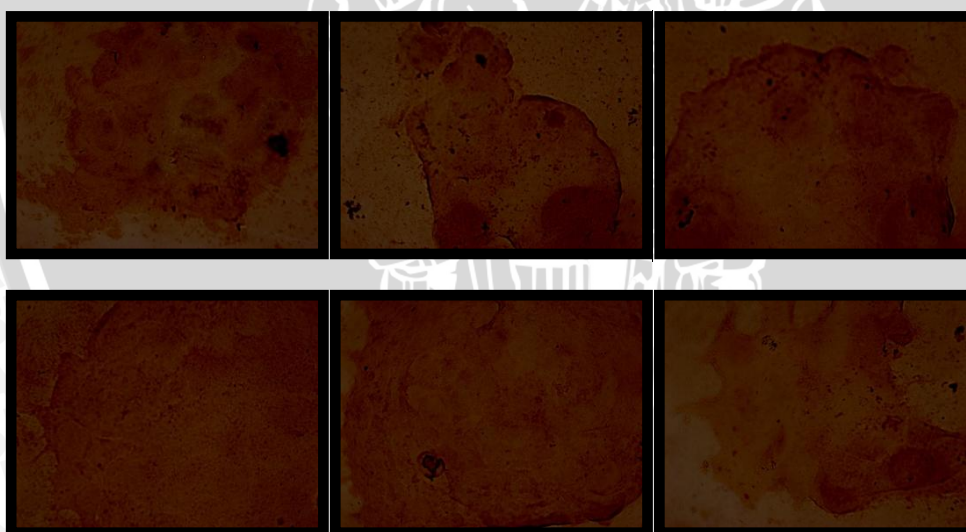


Lampiran 13. Penampakan Sel setelah Tunel Assay

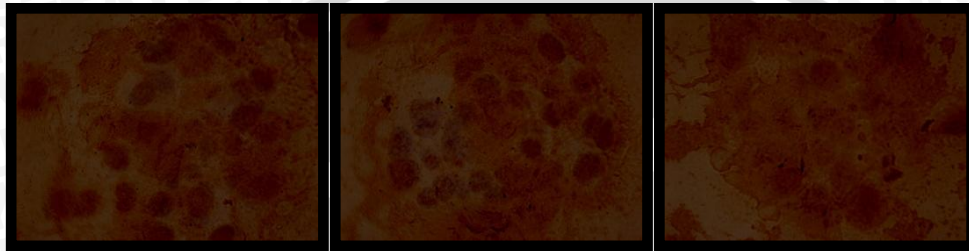
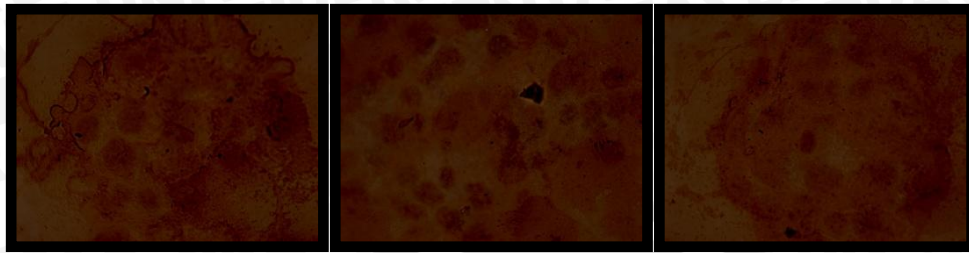
1). kontrol



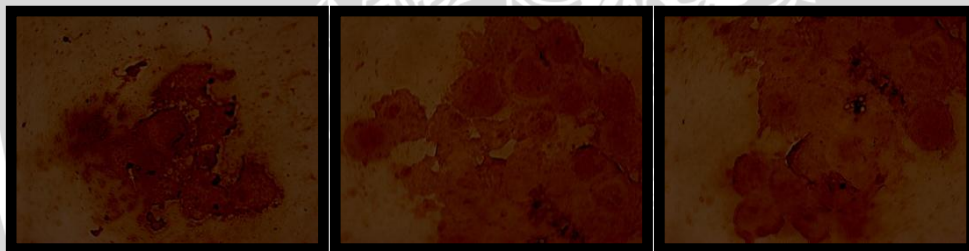
2). Setengah IC_{50}



3). IC_{50}



4). 2 x IC₅₀



Lampiran 14. Hasil Perhitungan Indeks Apoptosis

Perlakuan	Lapang	Replikasi 1		Replikasi 2		Replikasi 3		Replikasi 4		Replikasi 5		Replikasi 6	
	Pandang	Apoptosis	Total Sel	Apoptosis	Total Sel	Apoptosis	Total Sel	Apoptosis	Total Sel	Apoptosis	Total Sel	Apoptosis	Total Sel
Kontrol	1	4	13	0	10	1	11	4	8	2	8	1	7
	2	1	10	4	5	3	5	0	8	2	12	6	28
	Total	5	23	4	15	4	16	4	16	4	20	7	35
	Indeks	21,74		26,67		25,00		25,00		20,00		20,00	
1/2 x IC50	1	3	10	2	7	5	12	2	8	7	7	1	7
	2	2	8	2	5	2	6	8	14	1	11	2	4
	Total	5	18	4	12	7	18	10	22	8	18	3	11
	Indeks	27,78		33,33		38,89		45,45		44,44		27,27	
IC50	1	8	8	5	10	7	25	9	17	15	27	6	10
	2	8	17	8	14	8	8	8	8	7	14	10	15
	Total	16	25	13	24	15	33	17	25	22	41	16	25
	Indeks	64		54,17		45,45		68		53,66		64	
2 x IC50	1	14	19	5	5	7	7	5	5	10	11	17	18
	2	7	7	6	7	5	6	2	2	3	3	5	5
	Total	19	24	11	12	12	13	9	9	13	14	22	23
	Indeks	79,17		91,67		92,31		100,00		92,86		95,65	

Lampiran 15. Analisa Deskriptif MTT 2

Descriptives			
		Statistic	Std. Error
Persen_Kematian_MTT2	Mean	63,83659	1,879720
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	60,10330
		Upper Bound	67,56988
	5% Trimmed Mean	65,72360	
	Median	65,65400	
	Variance	328,601	
	Std. Deviation	18,127367	
	Minimum	-9,346	
	Maximum	82,243	
	Range	91,589	
	Interquartile Range	22,197	
	Skewness	-1,652	,250
	Kurtosis	3,533	,495

Lampiran 16. Uji Normalitas *Shapiro-Wilk* MTT 2

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Persen_Kematia n	,167	90	,000	,894	90	,000

a. Lilliefors Significance Correction

Tests of Normality							
	Konsentrasi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Persen_Hambatan_Proliferasi_MT	kontrol	,196	3	.	,996	3	,879
T2	1200	,327	3	.	,871	3	,299
	1250	,364	3	.	,800	3	,114
	1400	,176	3	.	1,000	3	,982
	1600	,293	3	.	,922	3	,459
	1800	,253	3	.	,964	3	,637
	2000	,219	3	.	,987	3	,781
	2200	,284	3	.	,934	3	,503
	2400	,245	3	.	,971	3	,672
	2500	,385	3	.	,750	3	,000
	2600	,354	3	.	,821	3	,165
	2800	,328	3	.	,871	3	,298
	3000	,304	3	.	,907	3	,408
	3200	,321	3	.	,881	3	,327
	3400	,370	3	.	,786	3	,081
	3600	,235	3	.	,978	3	,712
	3800	,175	3	.	1,000	3	1,000
	4000	,385	3	.	,750	3	,000
	4200	,369	3	.	,789	3	,089
	4400	,274	3	.	,945	3	,546
	4600	,385	3	.	,750	3	,000
	4800	,175	3	.	1,000	3	,999
	5000	,261	3	.	,958	3	,604
	5200	,293	3	.	,922	3	,460
	5400	,187	3	.	,998	3	,915
	5600	,175	3	.	1,000	3	,998
	5800	,292	3	.	,923	3	,463
	6000	,305	3	.	,907	3	,407
	6200	,212	3	.	,990	3	,811
	10000	,175	3	.	1,000	3	1,000
	20000	,196	3	.	,996	3	,879

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 17. Uji Homogenitas Levene MTT 2

Test of Homogeneity of Variances			
Persen_Hambatan_Proliferasi_MTT2			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4,032	30	62	,000

Lampiran 18. Uji Kruskal Wallis MTT 2

Test Statistics ^{a,b}	
	Konsentrasi
Chi-Square	,000
Df	1
Asymp. Sig.	1,000
a. Kruskal Wallis Test	
b. Grouping Variable:	
Persen_Hambatan_Proliferasi_MTT2	

Lampiran 19. Analisis Spearman MTT 2

Correlations				
		Konsentrasi	Persen_Hambatan_Proliferasi_MTT2	
Spearman's rho	Konsentrasi	Correlation Coefficient	1,000	,881**
		Sig. (2-tailed)	.	,000
		N	93	93
	Persen_Hambatan_Proliferasi_MTT2	Correlation Coefficient	,881**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	.
		N	93	93

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Lampiran 20. Analisis Deskriptif Caspase-9

Descriptives

Ratarata_Indeks_Ekspresi_Caspase9

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower	Upper		
					Bound	Bound		
kontrol	6	18,4967	,47149	,19249	18,0019	18,9915	17,69	18,95
1/2	6	22,2450	,89937	,36717	21,3012	23,1888	21,39	23,81
IC50	6	32,8617	1,03910	,42421	31,7712	33,9521	31,54	34,54
2 x	6	75,3017	1,18263	,48281	74,0606	76,5428	73,39	76,42
IC50	6	75,3017	1,18263	,48281	74,0606	76,5428	73,39	76,42
Total	24	37,2263	23,10814	4,71693	27,4685	46,9840	17,69	76,42



Lampiran 21. Uji Normalitas *Shapiro-Wilk* Caspase-9

Tests of Normality							
an	Perlaku	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ratarata_Indeks_Ekspr esi_Caspase9	kontrol	,302	6	,092	,861	6	,191
	1/2 IC50	,257	6	,200*	,892	6	,327
	IC50	,213	6	,200*	,967	6	,874
	2 x IC50	,308	6	,078	,853	6	,168

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 22. Uji Homogenitas *Levene* Caspase-9

Test of Homogeneity of Variances				
Ratarata_Indeks_Ekspresi_Caspase9				
Levene	df1	df2	Sig.	
Statistic				
1,489	3	20	,248	

Lampiran 23. Analisis Varian (ANOVA) Caspase-9

ANOVA

Ratarata_Indeks_Ekspresi_Caspase9

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12264,133	3	4088,044	4659,364	,000
Within Groups	17,548	20	,877		
Total	12281,680	23			



Lampiran 24. Uji Post Hoc Caspase-9

Multiple Comparisons							
Dependent Variable: Ratarata_Indeks_Ekspresi_Caspase9							
	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	Kontrol	Control					
		1/2 IC50	-3,74833 [*]	,54080	,000	-5,2620	-2,2347
		IC50	-14,36500 [*]	,54080	,000	-15,8787	-12,8513
		2 x IC50	-56,80500 [*]	,54080	,000	-58,3187	-55,2913
	1/2 IC50	Control	3,74833 [*]	,54080	,000	2,2347	5,2620
		1/2 IC50					
		IC50	-10,61667 [*]	,54080	,000	-12,1303	-9,1030
		2 x IC50	-53,05667 [*]	,54080	,000	-54,5703	-51,5430
	IC50	Control	14,36500 [*]	,54080	,000	12,8513	15,8787
		1/2 IC50	10,61667 [*]	,54080	,000	9,1030	12,1303
		IC50					
		2 x IC50	-42,44000 [*]	,54080	,000	-43,9537	-40,9263
	2 x IC50	Control	56,80500 [*]	,54080	,000	55,2913	58,3187
		1/2 IC50	53,05667 [*]	,54080	,000	51,5430	54,5703
		IC50	42,44000 [*]	,54080	,000	40,9263	43,9537
		2 x IC50					
LSD	Kontrol	Control					
		1/2 IC50	-3,74833 [*]	,54080	,000	-4,8764	-2,6203
		IC50	-14,36500 [*]	,54080	,000	-15,4931	-13,2369
		2 x IC50	-56,80500 [*]	,54080	,000	-57,9331	-55,6769
	1/2 IC50	Control	3,74833 [*]	,54080	,000	2,6203	4,8764
		1/2 IC50					
		IC50	-10,61667 [*]	,54080	,000	-11,7447	-9,4886
		2 x IC50	-53,05667 [*]	,54080	,000	-54,1847	-51,9286
	IC50	Control	14,36500 [*]	,54080	,000	13,2369	15,4931
		1/2 IC50	10,61667 [*]	,54080	,000	9,4886	11,7447
		IC50					
		2 x IC50	-42,44000 [*]	,54080	,000	-43,5681	-41,3119
	2 x IC50	Control	56,80500 [*]	,54080	,000	55,6769	57,9331
		1/2 IC50	53,05667 [*]	,54080	,000	51,9286	54,1847
		IC50	42,44000 [*]	,54080	,000	41,3119	43,5681
		2 x IC50					

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 25. Uji Korelasi *Pearson Caspase-9*

Correlations			
		Perlakuan	Ratarata_Indeks_Ekspresi_Caspase9
Perlakuan	Pearson Correlation	1	,895**
	Sig. (2-tailed)		,000
	Sum of Squares and Cross-products	30,000	543,095
	Covariance	1,304	23,613
	N	24	24
Ratarata_Indeks_Ekspresi_Caspase9	Pearson Correlation	,895**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	Sum of Squares and Cross-products	543,095	12281,680
	Covariance	23,613	533,986
	N	24	24

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Lampiran 26. Analisa Deskriptif Apoptosis

Descriptives								
Apoptosis								
N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
				Lower Bound	Upper Bound			
kontrol	6	23,0683	2,86456	1,16945	20,0622	26,0745	20,00	26,67
1100	6	36,1933	7,99467	3,26381	27,8034	44,5832	27,27	45,45
2200	6	58,2150	8,51444	3,47601	49,2796	67,1504	45,46	68,00
4400	6	91,9433	6,96931	2,84521	84,6295	99,2572	79,17	100,00
Total	24	52,3550	27,41694	5,59646	40,7778	63,9322	20,00	100,00

Lampiran 27. Uji Normalitas *Shapiro-Wilk* Apoptosis

Tests of Normality							
	konsentrasi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Apoptosis	kontrol	,250	6	,200 [*]	,872	6	,233
	1100	,187	6	,200 [*]	,889	6	,314
	2200	,252	6	,200 [*]	,920	6	,506
	4400	,318	6	,059	,873	6	,238

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 28. Uji Homogenitas *Levene* Apoptosis

Test of Homogeneity of Variances				
Apoptosis				
Levene Statistic	df1	df2	Sig.	
2,358	3	20	,102	

Lampiran 29. Analisis Varian (ANOVA) Apoptosis

ANOVA					
Apoptosis	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16322,904	3	5440,968	112,657	,000
Within Groups	965,938	20	48,297		
Total	17288,842	23			

Lampiran 30. Uji *Post Hoc* Apoptosis

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: Apoptosis						
Tukey HSD						
(I) konsentrasi	(J) konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	kontrol					
	1100	-13,12500*	4,01235	,018	-24,3553	-1,8947
	2200	-35,14667*	4,01235	,000	-46,3770	-23,9163
1100	4400	-68,87500*	4,01235	,000	-80,1053	-57,6447
	kontrol	13,12500*	4,01235	,018	1,8947	24,3553
	1100					
2200	2200	-22,02167*	4,01235	,000	-33,2520	-10,7913
	4400	-55,75000*	4,01235	,000	-66,9803	-44,5197
	kontrol	35,14667*	4,01235	,000	23,9163	46,3770
4400	1100	22,02167*	4,01235	,000	10,7913	33,2520
	2200					
	4400	-33,72833*	4,01235	,000	-44,9587	-22,4980
4400	kontrol	68,87500*	4,01235	,000	57,6447	80,1053
	1100	55,75000*	4,01235	,000	44,5197	66,9803
	2200	33,72833*	4,01235	,000	22,4980	44,9587
4400	4400					

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 31. Uji Korelasi Pearson Apoptosis

Correlations			
		Konsentrasi	Apoptosis
konsentrasi	Pearson Correlation	1	,952**
	Sig. (2-tailed)		,000
	Sum of Squares and Cross-products	30,000	685,940
	Covariance	1,304	29,823
	N	24	24
Apoptosis	Pearson Correlation	,952**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	Sum of Squares and Cross-products	685,940	17288,842
	Covariance	29,823	751,689
	N	24	24

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



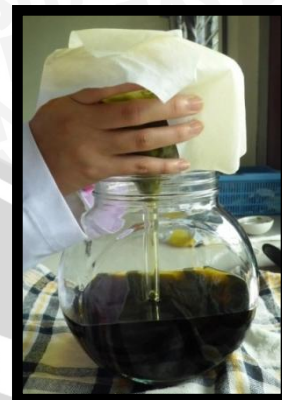
Lampiran 32. Dokumentasi Kegiatan



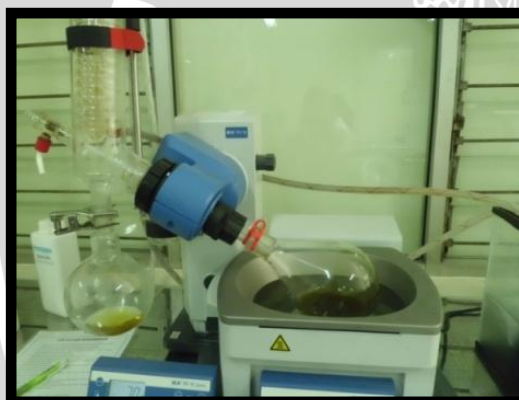
Ekstraksi maserasi
daun kelor (*M.oleifera*)



Ekstrak distirer
30 menit



Ekstraksi
disaring



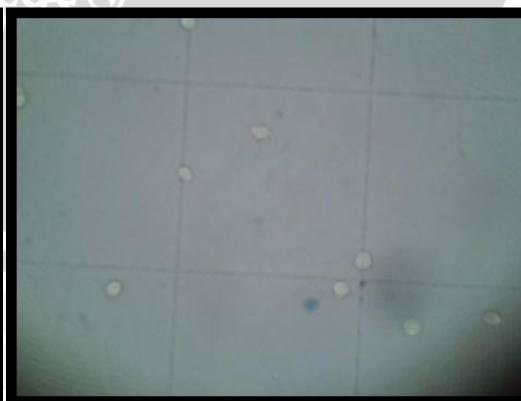
Pemisahan pelarut ekstraksi
dengan Rotary Evaporator



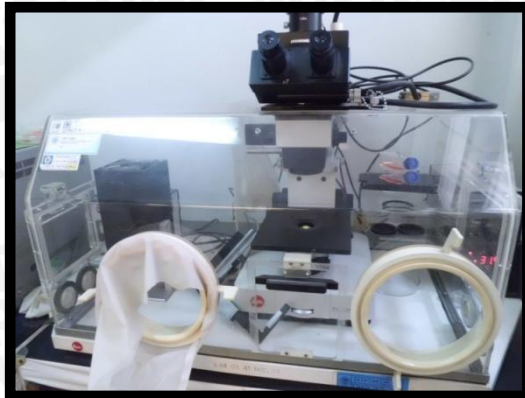
Pengeringan ekstrak
dengan Vacuum Oven



Pemanenan Sel MCF-7



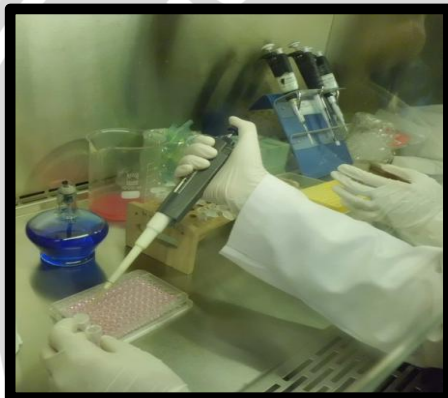
Perhitungan jumlah sel MCF-7
menggunakan hemacytometer



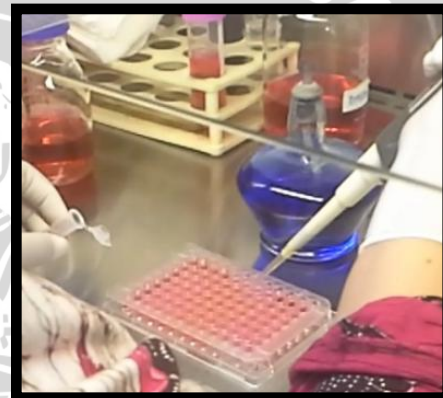
Penampakan sel dilihat menggunakan mikroskop



Pengenceran ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) sesuai konsentrasi



Sel dan media diletakan pada well plate 96 untuk MTT



Pemaparan ekstrak pada well plate 96 untuk MTT Assay

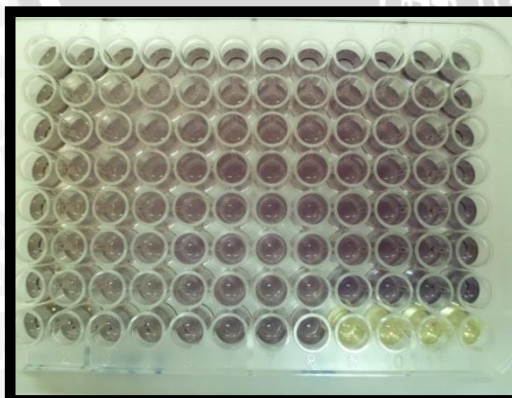


Foto sel setelah diberi *stop solution* pada MTT 1 → sel masih banyak yang berwarna ungu (masih hidup)

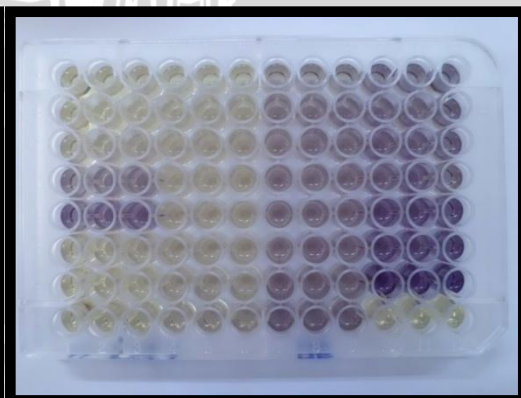


Foto sel setelah diberi *stop solution* pada MTT 2 → sel banyak yang berwarna kuning (sudah mati)



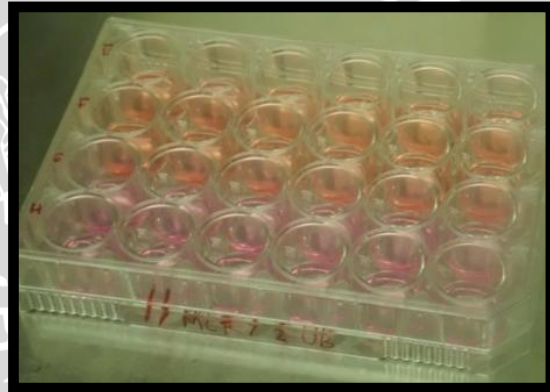
inkubasi sel dalam inkubator pada suhu 37 °C dengan kadar CO₂ 5%



Pembacaan absorbansi menggunakan *Microplate Reader* pada panjang gelombang 550nm



Pemaparan ekstrak ke *well plate* 24 untuk imunositokimia



Sampel dalam *well plate* 24 untuk imunositokimia



Penempelan cover slip ke cover glass menggunakan entelan



Sampel diberi *Novocastra Protein Block* pada proses imunositokimia



Pemberian antibodi caspase-9 pada proses imunositokimia



Pemberian *Maye hematoxylin* pada proses imunositokimia



Penempelan cover diatas sampel yang sudah di imunositokimia



Vortex *Permeabilisation solution* pada proses apoptosis



Sampel ditambah *TUNEL Reaction Mixture* pada proses apoptosis



Sampel dicuci dengan PBS pada proses apoptosis



Sampel ditetesi *Permeabilisation Solution* pada proses apoptosis



Sampel ditetesi *Blocking Solution* pada proses apoptosis



Sampel diinkubasi pada proses apoptosis