

**EFEK EKSTRAK DAUN KELOR (*Moringa oleifera*) TERHADAP EKSPRESI  
HEAT SHOCK PROTEIN 27 (Hsp27) DAN APOPTOSIS SEL KANKER  
PAYUDARA MCF-7**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi**



Oleh :

**Erita Rahmani**

**NIM : 105070500111017**

**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2014**

DAFTAR ISI

Halaman

Halaman Judul .....	i
Halaman Pengesahan .....	ii
Kata Pengantar .....	iii
Abstrak .....	v
Abstract .....	vi
Daftar isi .....	vii
Daftar Tabel.....	xiii
Daftar Gambar .....	xiv
Daftar Lampiran .....	xv
Daftar Singkatan .....	xvi
 <b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	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
 <b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Kanker Payudara.....	6



2.1.1	Definisi .....	6
2.1.2	Epidemiologi .....	6
2.1.3	Faktor Resiko.....	7
2.1.3.1	Faktor Resiko Tetap .....	7
2.1.3.2	Faktor Resiko terkait Gaya Hidup .....	9
2.1.3.3	Faktor Resiko Lain.....	10
2.1.4	Patofisiologi.....	11
2.1.5	Terapi.....	14
2.1.5.1	Pembedahan .....	14
2.1.5.1.1	<i>Breast-conserving Surgery</i> .....	15
2.1.5.1.2	<i>Mastectomy</i> .....	15
2.1.5.1.3	<i>Lymph Node Surgery</i> .....	16
2.1.5.1.4	<i>Reconstructive Surgery</i> .....	17
2.1.5.2	Radiasi.....	17
2.1.5.3	Kemoterapi.....	18
2.1.5.4	Terapi Hormonal .....	20
2.1.5.5	<i>Targeted Therapy</i> .....	22
2.2	Sel MCF-7.....	23
2.3	<i>Heat shock protein (Hsp27)</i> .....	24
2.3.1	Fungsi Normal Hsp27 .....	24
2.3.2	Fungsi Hsp27 pada Sel Kanker.....	26
2.4	Apoptosis .....	27
2.4.1	Definisi .....	27
2.4.2	Jalur Apoptosis .....	30
2.4.2.1	Jalur Ekstrinsik.....	30



2.4.2.2	Jalur Intrinsik.....	31
2.5	Daun Kelor ( <i>Moringa oleifera</i> ) .....	32
2.5.1	Taksonomi.....	32
2.5.1.1	Klasifikasi.....	32
2.5.1.2	Nama Umum.....	33
2.5.1.3	Morfologi .....	33
2.5.1.4	Habitat.....	34
2.5.1.5	Persebaran .....	35
2.5.1.6	Khasiat.....	35
2.5.1.7	Kandungan Kimia .....	37
2.6	Ekstraksi .....	37
2.7	MTT Assay.....	40
2.8	Tunel Assay.....	40
 <b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS</b>		
3.1	Kerangka Konsep .....	42
3.2	Hipotesis Penelitian .....	45
 <b>BAB 4 METODE PENELITIAN</b>		
4.1	Rancangan Penelitian .....	46
4.2	Populasi dan Sampel.....	46
4.2.1	Penentuan IC <sub>50</sub> menggunakan MTT Assay.....	46
4.2.2	Pengujian Ekspresi Hsp27 dan Apoptosis .....	47
4.3	Variabel Penelitian.....	48
4.3.1	Variabel Bebas.....	48
4.3.2	Variabel Terikat.....	48

4.4	Lokasi dan Waktu Penelitian .....	48
4.5	Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian .....	49
4.5.1	Kultur Sel MCF-7 .....	49
4.5.2	Maserasi.....	49
4.5.3	Pemaparan pada Kultur Sel .....	49
4.5.4	Penentuan Kualitatif Fitokimia .....	49
4.5.5	Penentuan IC <sub>50</sub> menggunakan MTT Assay.....	49
4.5.6	Pengujian Ekspresi Hsp27 menggunakan Metode Imunositokimia .....	50
4.5.7	Pengujian Apoptosis menggunakan Tunel Assay.....	50
4.6	Definisi Istilah/Operasional.....	50
4.7	Prosedur Penelitian .....	51
4.7.1	Maserasi Daun Kelor` .....	51
4.7.2	Uji Kualitatif Fitokimia .....	51
4.7.3	Kultur Sel MCF-7 .....	52
4.7.3.1	Penumbuhan Sel .....	52
4.7.3.2	Pergantian Media.....	53
4.7.3.3	Pemanenan Sel .....	53
4.7.3.4	Perhitungan Sel.....	54
4.7.3.5	Subkultur Sel .....	55
4.7.4	Pemaparan Ekstrak Daun Kelor ( <i>Moringa oleifera</i> ) pada Kultur Sel.....	55
4.7.5	Penentuan IC <sub>50</sub> menggunakan MTT Assay.....	55
4.7.6	Pengujian Ekspresi Hsp27 menggunakan metode Imunositokimia .....	56
4.7.7	Pengujian Apoptosis menggunakan Tunel Assay.....	60
4.8	Analisis Data .....	61

4.9 Kerangka Penelitian .....	63
-------------------------------	----

**BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA**

5.1 Hasil Penelitian .....	64
5.1.1 Hasil Ekstraksi dan Uji Fitokimia .....	64
5.1.2 Hasil Penentuan IC <sub>50</sub> menggunakan MTT Assay.....	65
5.1.3 Hasil Pengujian Ekspresi Hsp27 menggunakan Imunositokimia.....	66
5.1.4 Hasil Pengujian Apoptosis menggunakan TUNEL Assay .....	70
5.2 Analisa Data .....	72
5.2.1 Hasil Penentuan IC <sub>50</sub> menggunakan MTT Assay.....	72
5.2.1.1 Uji Normalitas dan Homogenitas .....	72
5.2.1.2 Uji Spearman.....	73
5.2.2 Hasil Pengujian Ekspresi Hsp27 menggunakan Imunositokimia.....	73
5.2.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas .....	73
5.2.2.2 Uji One Way ANOVA .....	74
5.2.2.3 Uji Post Hoc.....	74
5.2.2.4 Uji Pearson.....	75
5.2.3 Hasil Pengujian Apoptosis menggunakan TUNEL Assay.....	75
5.2.3.1 Uji Normalitas dan Homogenitas .....	75
5.2.3.2 Uji One Way ANOVA .....	76
5.2.3.3 Uji Post Hoc.....	76
5.2.3.4 Uji Pearson.....	77

**BAB 6 PEMBAHASAN**

6.1 Uji Fitokimia Ekstrak Daun Kelor ( <i>Moringa oleifera</i> ) .....	78
6.2 Ekstrak Daun Kelor ( <i>Moringa oleifera</i> ) terhadap Hasil MTT Assay.....	78





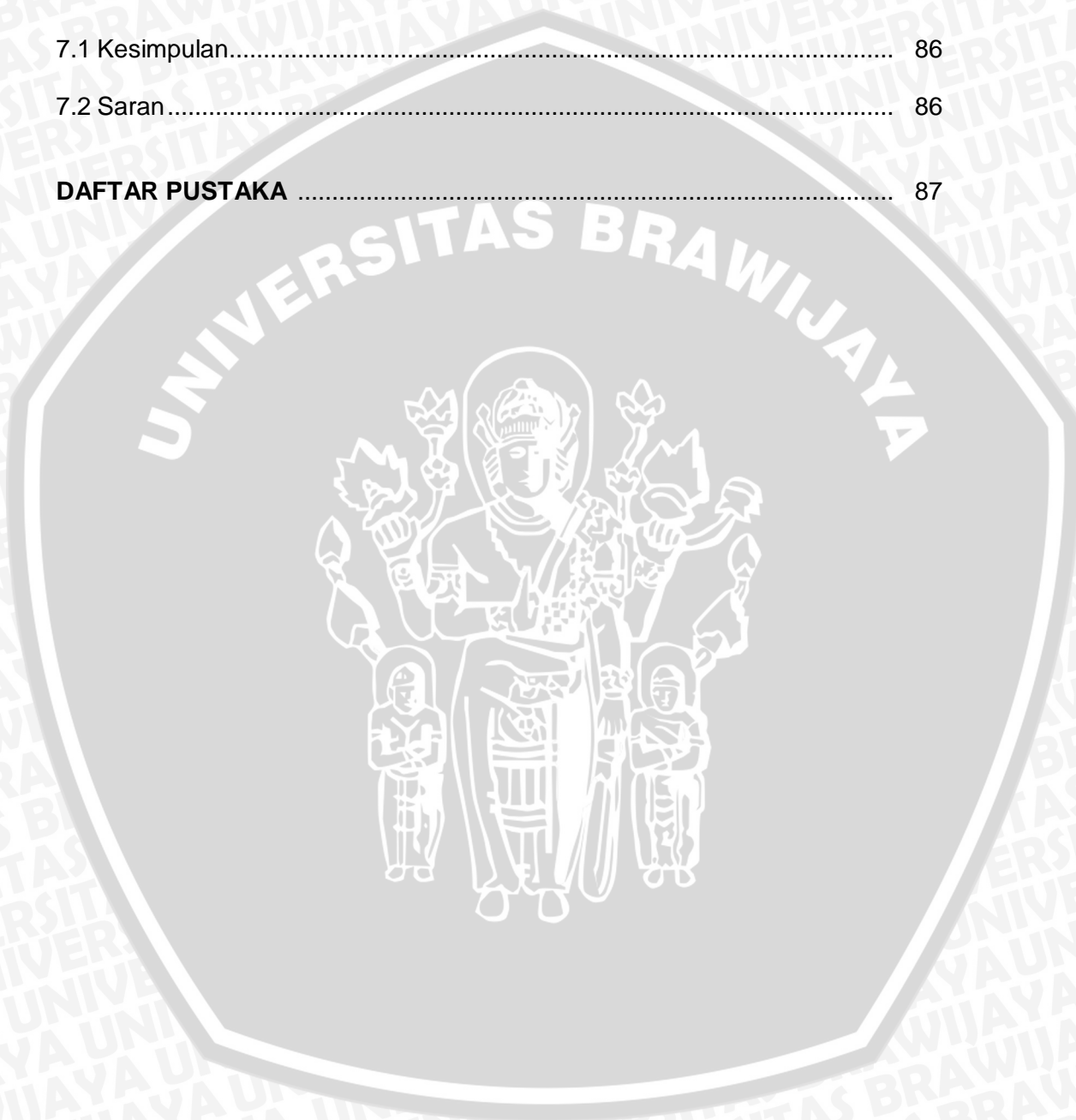
6.3 Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Ekspresi Hsp27 dan Apoptosis Sel Kanker Payudara MCF-7 ..... 80

**BAB 7 PENUTUP**

7.1 Kesimpulan..... 86

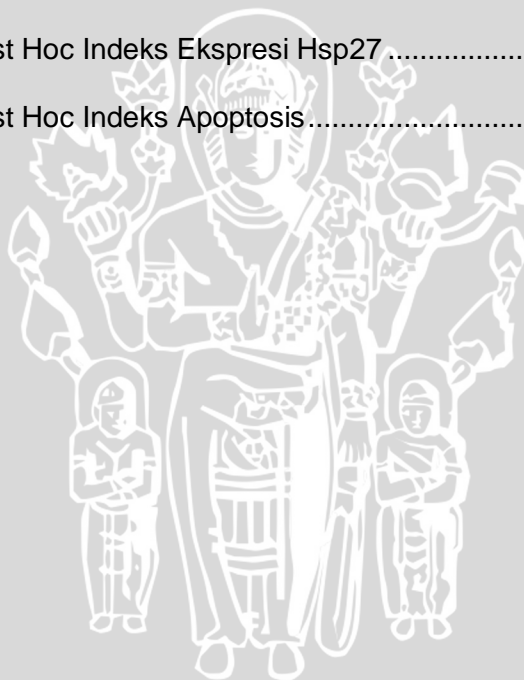
7.2 Saran..... 86

**DAFTAR PUSTAKA** ..... 87



DAFTAR TABEL

	Halaman
<b>Tabel 4.1</b> Pembagian Kelompok Perlakuan MTT .....	47
<b>Tabel 4.2</b> Pembagian Kelompok Perlakuan Pengujian Hsp27 dan Apoptosis	48
<b>Tabel 5.1</b> Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Kelor ( <i>Moringa oleifera</i> ) .....	64
<b>Tabel 5.2</b> Hasil Penentuan IC <sub>50</sub> menggunakan MTT Assay .....	65
<b>Tabel 5.4</b> Rata-Rata Indeks Ekspresi Hsp27 .....	69
<b>Tabel 5.5</b> Rata-Rata Indeks Apoptosis .....	71
<b>Tabel 5.6</b> Hasil Uji Post Hoc Indeks Ekspresi Hsp27 .....	74
<b>Tabel 5.7</b> Hasil Uji Post Hoc Indeks Apoptosis .....	76





DAFTAR GAMBAR

	Halaman
<b>Gambar 2.1</b> Mutasi BRCA1 dan Perkembangan Kanker .....	14
<b>Gambar 2.2</b> Peran Hsp27 terhadap Apoptosis dan Kelangsungan Hidup Sel .....	25
<b>Gambar 2.3</b> Jalur Signaling Apoptosis.....	28
<b>Gambar 2.4</b> Daun Kelor .....	32
<b>Gambar 3.1</b> Kerangka Konsep.....	42
<b>Gambar 4.1</b> Alur Penelitian .....	63
<b>Gambar 5.1</b> Kurva Dosis Ekstrak terhadap Kematian Sel .....	66
<b>Gambar 5.2</b> Penampakan Mikroskopik Sel MCF-7 pada Perbesaran 1000x	67
<b>Gambar 5.3</b> Penampakan Mikroskopik Hasil Imunositokimia Sel MCF-7 setelah Perlakuan.....	68
<b>Gambar 5.4</b> Grafik Dosis Ekstrak terhadap Rata-Rata Indeks Ekspresi Hsp27	70
<b>Gambar 5.5</b> Penampakan Mikroskopik Hasil TUNEL Assay Sel MCF-7 setelah Perlakuan.....	71
<b>Gambar 5.6</b> Grafik Dosis Ekstrak Terhadap Rata-Rata Indeks Apoptosis ....	72



## DAFTAR LAMPIRAN

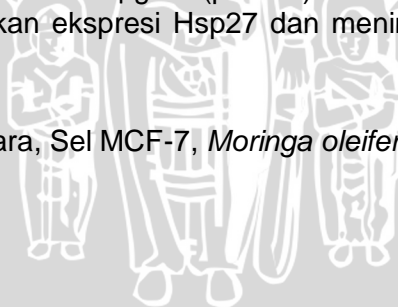
<b>Lampiran 1</b> Pernyataan Keaslian Tulisan .....	94
<b>Lampiran 2</b> Keterangan Kelaikan Etik .....	95
<b>Lampiran 3</b> Determinasi Daun Kelor .....	96
<b>Lampiran 4</b> Hasil Pengamatan Uji Fitokimia .....	97
<b>Lampiran 5</b> Hasil Perhitungan Indeks Ekspresi Hsp27 .....	99
<b>Lampiran 6</b> Hasil Perhitungan Indeks Apoptosis .....	101
<b>Lampiran 7</b> Uji Normalitas, Uji Homogenitas, dan Uji Spearman Penentuan IC <sub>50</sub> menggunakan MTT Assay.....	102
<b>Lampiran 8</b> Uji Normalitas, Uji Homogenitas, Uji ANOVA, Uji Post Hoc, dan Uji Pearson Pengujian Ekspresi Hsp27 menggunakan Metode Imunositokimia .....	104
<b>Lampiran 9</b> Uji Normalitas, Uji Homogenitas, Uji ANOVA, Uji Post Hoc, dan Uji Pearson Pengujian Apoptosis menggunakan TUNEL Assay....	106

## ABSTRAK

Rahmani, Erita. 2014. **Efek Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Ekspresi *Heat Shock Protein 27* (Hsp27) dan Apoptosis Sel Kanker Payudara MCF-7**. Tugas Akhir, Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pembimbing : (1) dr. Hidayat Sujuti, Sp.M., Ph.D (2) Valentina Yurina, S.Si., M.Si.

Hsp27 terekspresi secara berlebihan pada kanker payudara sebagai respon terhadap kondisi stres. Ekspresi Hsp27 yang berlebihan dapat menghambat apoptosis dan mencegah aktivasi caspase. Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) memiliki kandungan flavonoid yang memiliki aktivitas antikanker. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui dosis  $IC_{50}$ , pengaruh ekspresi Hsp27 dan apoptosis pada sel MCF-7 oleh ekstrak daun kelor. Studi eksperimental dengan *post-test only design* dilakukan pada sel MCF-7. Serbuk daun kelor dimaserasi menggunakan etanol 70%. MTT Assay dilakukan pada MCF-7 yang diberi ekstrak daun kelor dengan dosis 7.813-20000  $\mu\text{g/ml}$ . Sel diberikan ekstrak daun kelor pada dosis 1100, 2200 dan 4400  $\mu\text{g/ml}$  dan kemudian dilakukan uji ekspresi Hsp27 (uji imunositokimia) dan apoptosis (TUNEL assay). Selanjutnya, ditentukan indeks ekspresi Hsp27 dan apoptosis, kemudian dilakukan analisis data. Hasil penelitian menunjukkan bahwa  $IC_{50}$  ekstrak daun kelor adalah 2200  $\mu\text{g/ml}$ . Ekstrak daun kelor mampu menurunkan ekspresi Hsp27 secara signifikan pada dosis 2200 dan 4400  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.05$ ). Ekstrak daun kelor mampu meningkatkan apoptosis sel MCF-7 secara signifikan pada dosis 1100, 2200, dan 4400  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.05$ ). Ekstrak daun kelor sebagai antikanker dapat menurunkan ekspresi Hsp27 dan meningkatkan apoptosis sel kanker payudara MCF-7.

Kata Kunci : Kanker payudara, Sel MCF-7, *Moringa oleifera*, Hsp27, apoptosis



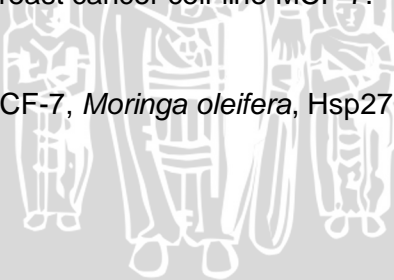


## ABSTRACT

Rahmani, Erita. 2014. **Effect of Drumstick Leaves Extract (*Moringa oleifera*) on Heat Shock Protein 27 (Hsp27) Expression and Apoptosis of Breast Cancer Cell-line MCF-7**. Final Assignment, School of Pharmacy, Medical Faculty, Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Hidayat Sujuti, Sp.M., Ph.D (2) Valentina Yurina, S.Si., M.Si.

Hsp27 is overexpressed in breast cancer as a response to stress condition. Hsp27 overexpression leads to apoptosis inhibition and caspase activation prevention. Drumstick leaves extract (*Moringa oleifera*) contains flavonoids which have anticancer activity. This research was conducted to find out  $IC_{50}$ , effect on Hsp27 expression and apoptosis in MCF-7 cells by drumstick leaves extract. Experimental studies with post-test only design was done on MCF-7 cells. Drumstick leaves powder was macerated with ethanol 70%. MTT Assay was performed on mcf cell which were treated by drumstick leaves extract (7.813-20000  $\mu\text{g/ml}$ ). Furthermore, drumstick leaves extract treated cells (1100, 2200, and 4400  $\mu\text{g/ml}$ ) were assayed for its Hsp27 expression (immunocytochemistry) and apoptosis (TUNEL assay) test. Furthermore, the index of Hsp27 expression and apoptosis were determined, then the data was analyzed. The results showed that  $IC_{50}$  of drumstick leaves extract was at 2200  $\mu\text{g/ml}$ . Drumstick leaves extract was able to reduce Hsp27 expression significantly at 2200 and 4400  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.05$ ). Drumstick leaves extract was able to increase apoptosis cells significantly at 1100, 2200, and 4400  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.05$ ). Drumstick leaves extract as anticancer can reduce/decrease Hsp27 expression and increase apoptosis of breast cancer cell-line MCF-7.

Keyword : Breast cancer, MCF-7, *Moringa oleifera*, Hsp27, apoptosis



## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Kanker payudara merupakan kanker yang paling sering terjadi dan menjadi penyebab utama kematian akibat kanker pada wanita. Saat ini, kanker payudara menjadi penyebab utama kematian akibat kanker pada wanita di negara berkembang. Selain itu, penderita kanker di negara berkembang memiliki angka kelangsungan hidup yang rendah akibat diagnosis yang baru ditegakkan saat tahap akhir kanker dan terbatasnya akses pengobatan (Jemal *et al.*, 2011).

Berdasarkan data GLOBOCAN tahun 2008, kanker payudara merupakan kanker yang paling sering terjadi pada wanita, dengan estimasi 1,38 juta kasus baru terdiagnosa pada tahun 2008 (23% dari semua jenis kanker), dan menempati urutan kedua (10,9%) di seluruh dunia dari semua jenis kanker. Selain itu, insiden kanker payudara di Indonesia tahun 2008 menempati urutan pertama berdasarkan ASR adalah sebesar 36,2 per 100.000 penduduk wanita dengan mortalitas mencapai 18,6 per 100.000 penduduk wanita (IARC, 2010).

Kanker merupakan kondisi penyakit di mana sel normal tumbuh secara tidak terkontrol dan berakumulasi membentuk massa yang disebut tumor. Sebagian besar kanker sangat progresif, dimulai dengan mutasi materi genetik (AACR, 2013). Mutasi tersebut disebabkan oleh paparan karsinogen terhadap sel normal (Dipiro *et al.*, 2008). Sel yang mengalami mutasi tersebut berkembang menjadi sel prekanker yang akan membentuk lesi. Selanjutnya, beberapa sel berkembang menjadi sel kanker, membentuk tumor. Mutasi yang berlanjut menyebabkan sel kanker mampu bermetastase (AACR, 2013).



Kanker payudara adalah tumor ganas yang terletak di sel payudara. Sel kanker payudara dapat berkembang menuju pembuluh limfe dan tumbuh di nodus limfe sehingga semakin besar resiko menyebar ke bagian tubuh lain (ACS, 2013). Pada kanker payudara, terjadi ekspresi *heat shock protein 27* (Hsp27) secara berlebihan (Chen *et al.*, 2012). Ekspresi yang berlebihan tersebut sebagai mekanisme pertahanan tubuh terhadap kerusakan sel karena adanya *heat shock* atau stimulus stres lain (Kanagasabai *et al.*, 2010). Hsp27 merupakan protein yang berperan dalam peningkatan tumorigenesitas, resisten terhadap terapi, dan inhibisi apoptosis (Casado *et al.*, 2007). Hsp27 sebagai inhibitor apoptosis menghambat rilis sitokrom c dari mitokondria menuju sitosol sehingga menghambat aktivasi *caspase-9* dan *caspase-3* (Rerole *et al.*, 2010).

Penatalaksanaan untuk kanker payudara menurut *American Cancer Society*, (ACS, 2013b), antara lain dengan pembedahan, radiasi, kemoterapi, terapi hormonal, dan terapi dengan target tertentu, seperti protein HER2. Prosedur tersebut mempunyai efek samping yang bervariasi, namun penggunaan tanaman obat untuk pengobatan kanker dinilai lebih aman (Ahmed *et al.*, 2013). Pustaka kuno kesehatan melaporkan bahwa pembedahan dilakukan untuk mengobati kanker, namun dokter juga merekomendasikan penggunaan produk alam, terutama produk tanaman (Nobili *et al.*, 2009).

Ayurveda, pengobatan tradisional India menggunakan tanaman obat, telah sukses dalam penggunaannya untuk mencegah atau menekan berbagai tumor. Salah satu tanaman yang digunakan dalam Ayurveda adalah daun kelor (*Moringa oleifera*) (Balachandran dan Rajgopal, 2005).

Daun kelor banyak di temukan di Indonesia. Daun kelor (*M. oleifera*) mengandung berbagai komponen kimia, termasuk flavonoid. Sebagian besar



flavonoid yang terkandung dalam daun kelor (*M. oleifera*) adalah kuersetin dan kaempferol (Goyal *et al.*, 2007). Kuersetin mampu menghambat hiperfosforilasi HSF-1 sehingga dapat menurunkan ekspresi Hsp27 (Rahmawati *et al.*, 2013).

Studi *in vitro* menggunakan HeLa *cell line*, menunjukkan bahwa ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) mengaktivasi jalur apoptosis. Jumlah sel yang mengalami apoptosis meningkat seiring peningkatan konsentrasi ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dari 10 sampai 100 µg/ml (Nair dan Varalakshmi, 2013). Pada studi *in vivo*, ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) terbukti menurunkan ekspresi Hsp25 pada jaringan kolon tikus, homolog Hsp27 pada manusia. Pada studi tersebut, ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) diberikan dalam tiga dosis berbeda (20, 40, dan 80 mg/kg/hari) kepada tikus karsinogenesis kolon yang diinduksi DMBA. Hasil penelitian menunjukkan adanya penurunan jumlah sel yang mengekspresikan Hsp25 pada jaringan kolon tikus Wistar pada dosis 20 dan 40 mg/kg/hari dibandingkan dengan kelompok kontrol, namun, pada dosis 80 mg/kg terjadi peningkatan Hsp25 (Rahmawati *et al.*, 2013). Studi mengenai ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) terhadap perubahan ekspresi Hsp27 pada sel kanker payudara MCF-7 belum ada. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk membuktikan ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) sebagai antikanker secara *in vitro* menggunakan sel kanker payudara (MCF-7 *cell-line*) dengan mengukur perubahan ekspresi Hsp27 dan apoptosis.

## 1.2 Rumusan Masalah

- 1) Apakah ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dapat menurunkan ekspresi Hsp27 pada kultur sel MCF-7?

- 2) Apakah ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dapat meningkatkan apoptosis sel MCF-7?
- 3) Berapakah nilai *Inhibition Concentration 50* (IC<sub>50</sub>) ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) terhadap sel MCF-7?

### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan efek ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dalam menurunkan ekspresi Hsp27 dan meningkatkan apoptosis pada sel MCF-7

#### 1.3.2 Tujuan khusus

- 1) Mengetahui hubungan antara berbagai dosis ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) terhadap ekspresi Hsp27 sel MCF-7
- 2) Mengetahui hubungan antara berbagai dosis ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) terhadap apoptosis sel MCF-7
- 3) Mengetahui IC<sub>50</sub> ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) terhadap sel MCF-7.

### 1.4 Manfaat Penelitian

#### 1.4.1 Manfaat Akademik

Sebagai dasar pemikiran tentang efek antikanker ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) terhadap sel kanker payudara sehingga diharapkan dapat dilanjutkan oleh peneliti lain agar dapat diimplementasikan pada manusia, serta dapat menjadi sumber inspirasi untuk penelitian selanjutnya.

#### 1.4.2 Manfaat Praktis

Sebagai dasar teori untuk menambah wawasan dan memberikan penjelasan mengenai efek ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) terhadap perubahan ekspresi Hsp27 pada sel MCF-7 sebagai terapi untuk penyakit kanker payudara, dan sebagai kontribusi gagasan bagi masyarakat tentang pemanfaatan daun kelor (*M. oleifera*) sebagai terapi untuk penyakit kanker payudara.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA





## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Kanker Payudara

##### 2.1.1 Definisi

Kanker merupakan kondisi dimana sel tumbuh secara abnormal karena berbagai perubahan pada ekspresi gen yang memicu ketidakseimbangan pada proliferasi sel dan kematian sel. Kanker ditandai dengan adanya perubahan ekspresi berbagai gen sehingga memicu gangguan regulasi program seluler normal untuk membelah dan berdiferensiasi. Akibatnya, terjadi ketidakseimbangan pada pembelahan dan kematian sel yang memicu pertumbuhan populasi sel (Ruddon, 2007).

Kanker payudara adalah tumor ganas yang terletak di sel payudara. Gejala yang muncul adalah adanya benjolan atau massa yang tidak menimbulkan nyeri, keras, dan memiliki ujung yang tidak teratur yang mungkin menjadi kanker. Namun, kanker payudara dapat berupa benjolan bulat yang lembek dan lembut, serta nyeri (ACS, 2013a).

Tanda adanya kanker payudara, antara lain bengkak seluruh atau sebagian payudara, iritasi pada kulit, nyeri pada payudara atau puting, retraksi puting (mengarah ke dalam), kemerahan atau penebalan pada puting atau kulit payudara, dan keluar cairan lain selain ASI dari puting (ACS, 2013a).

##### 2.1.2 Epidemiologi

Kanker payudara merupakan kanker kedua terbanyak setelah kanker leher rahim pada wanita di Indonesia. Menurut data GLOBOCAN, IARC (2002),

insiden kanker payudara di Indonesia berdasarkan ASR adalah sebesar 26 per 100.000 penduduk wanita dengan mortalitas mencapai 11,3 per 100.000 penduduk wanita (Budiman, 2013).

Berdasarkan data GLOBOCAN tahun 2008, kanker payudara terjadi pada wanita dengan estimasi 1,38 juta kasus baru terdiagnosa pada tahun 2008 (23% dari semua jenis kanker) dan menempati urutan kedua (10,9%) dari semua jenis kanker. Di Indonesia, tahun 2008, kanker payudara menempati urutan pertama berdasarkan ASR adalah sebesar 36,2 per 100.000 penduduk wanita dengan mortalitas mencapai 18,6 per 100.000 penduduk wanita (IARC, 2010).

### **2.1.3 Faktor Resiko**

Faktor resiko merupakan hal yang mempengaruhi kemungkinan mengalami penyakit, seperti kanker. Namun, memiliki faktor resiko, bahkan beberapa faktor resiko, tidak berarti bahwa seseorang pasti akan mengalami penyakit. Sebagian besar wanita yang memiliki salah satu atau beberapa faktor resiko kanker payudara tidak pernah mengalami kanker payudara, sedangkan wanita yang mengalami kanker payudara sebagian besar tidak memiliki faktor resiko kanker payudara (ACS, 2013a).

#### **2.1.3.1 Faktor Resiko Tetap**

Faktor resiko tetap adalah faktor resiko kanker payudara yang tidak dapat diubah, antara lain (ACS, 2013a),

- 1) Jenis kelamin. Wanita mempunyai resiko terkena kanker payudara lebih tinggi daripada pria karena memiliki hormon estrogen dan progesteron yang lebih tinggi, yang dapat memicu pertumbuhan sel kanker.

- 2) Usia. Bertambahnya usia maka semakin tinggi pula resiko terkena kanker payudara.
- 3) Genetik. 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%.
- 4) Riwayat keluarga. Resiko terkena kanker payudara lebih tinggi bagi wanita yang memiliki keturunan menderita kanker payudara. Seseorang, dimana kerabat relatif tingkat pertama (ibu, saudara perempuan, atau anak perempuan) memiliki riwayat kanker payudara, maka faktor resikonya 2 kali lebih tinggi. Sedangkan, seseorang, dimana terdapat dua orang dalam kerabat relatif tingkat pertama yang pernah menderita kanker, maka resikonya 3 kali lebih tinggi.
- 5) Riwayat personal. Wanita yang pernah menderita kanker payudara memiliki resiko 3-4 kali lebih tinggi mengalami kanker di bagian payudara lain maupun di bagian payudara yang sama.
- 6) Ras dan etnik. Wanita berkulit putih memiliki resiko mengalami kanker payudara yang lebih rendah dibandingkan dengan wanita berkulit hitam.
- 7) Kepadatan jaringan payudara. Wanita yang memiliki kepadatan jaringan payudara yang lebih tinggi memiliki resiko yang lebih tinggi pula terkena kanker payudara. Faktor yang mempengaruhi kepadatan jaringan payudara adalah usia, status menopause, penggunaan obat (seperti terapi hormonal menopause), kehamilan, dan genetik.



- 8) Tumor jinak payudara. Wanita yang didiagnosa mengalami tumor jinak payudara memiliki resiko yang lebih tinggi mengalami kanker payudara.
- 9) *Lobular carcinoma in situ* (LCIS). Pada sel LCIS, sel kanker tumbuh pada lobulus jaringan penghasil air susu, namun tidak tumbuh melewati dinding lobulus. Wanita dengan LCIS memiliki resiko 7-11 kali lebih tinggi mengalami kanker payudara.
- 10) Periode menstruasi. Wanita yang mengalami menstruasi lebih awal (<12 tahun) dan/atau mengalami menopause yang lambat (>55 tahun) memiliki resiko yang lebih tinggi mengalami kanker payudara.
- 11) Riwayat radiasi pada dada. Wanita yang pernah menerima terapi radiasi pada area dada untuk terapi kanker lain memiliki resiko yang lebih tinggi mengalami kanker payudara. Namun, resiko kanker payudara bervariasi berdasarkan usia saat menerima terapi radiasi pada dada, dimana bila menerima terapi radiasi pada usia remaja maka resiko akan lebih tinggi karena payudara masih berkembang.
- 12) Paparan *diethylstilbestrol* (DES). Wanita yang mengonsumsi DES saat hamil memiliki resiko yang lebih tinggi terkena kanker payudara.

### 2.1.3.2 Faktor Resiko terkait Gaya Hidup

Faktor resiko terkait gaya hidup yang dapat memicu kanker payudara sebagai berikut (ACS, 2013a),

- 1) Wanita yang tidak memiliki anak atau yang melahirkan saat usia  $\geq 30$  tahun memiliki resiko lebih tinggi mengalami kanker payudara.
- 2) Wanita yang menggunakan terapi untuk mengontrol kehamilan, seperti kontrasepsi oral, memiliki resiko lebih tinggi mengalami kanker payudara.

- 3) Wanita yang pernah menerima terapi hormonal setelah menopause memiliki resiko lebih tinggi mengalami kanker payudara .
- 4) Wanita yang tidak menyusui, terutama selama 1 ½ sampai 2 tahun setelah melahirkan, memiliki resiko lebih tinggi mengalami kanker payudara.
- 5) Konsumsi alkohol dapat meningkatkan resiko terkena kanker payudara.
- 6) Kelebihan berat badan atau obesitas dapat meningkatkan resiko terkena kanker payudara. Wanita dengan berat badan yang berlebih akan memungkinkan terjadi kelebihan level insulin sehingga akan memicu kanker payudara. Selain itu, sebelum menopause, ovarium dan jaringan lemak akan memproduksi estrogen. Setelah menopause (ketika ovarium berhenti memproduksi estrogen), sebagian besar estrogen dihasilkan oleh jaringan lemak. Wanita yang memiliki jaringan lemak tinggi setelah menopause akan mengalami peningkatan resiko mengalami kanker payudara akibat tingginya level estrogen.
- 7) Wanita yang memiliki aktivitas fisik yang rendah memiliki resiko yang lebih tinggi terkena kanker payudara. *American Cancer Society* merekomendasikan untuk melakukan aktivitas fisik sekitar 45-60 menit selama 5 hari atau lebih dalam seminggu.

### 2.1.3.3 Faktor Resiko Lain

Faktor resiko lain adalah faktor resiko yang efeknya masih belum jelas dan kontroversial terhadap resiko kanker payudara, antara lain (ACS, 2013a),

- 1) Diet dan asupan vitamin.
- 2) Lingkungan yang mengandung bahan kimia, seperti plastik, produk kosmetik dan perawatan diri, pestisida, dan *polychlorinated biphenyls* (PCBs).



- 3) Asap rokok
- 4) Antiperspiran
- 5) Implan payudara
- 6) Aborsi

#### 2.1.4 Patofisiologi

Karsinogenesis merupakan proses yang diregulasi secara genetik. Tahap pertama adalah inisiasi, yang membutuhkan paparan substansi karsinogenik pada sel normal. Karsinogen tersebut menyebabkan kerusakan genetik, yang bila tidak diperbaiki akan menyebabkan mutasi seluler yang tidak reversibel. Sel yang mengalami mutasi tersebut mengalami perubahan respon terhadap lingkungan sehingga meningkatkan potensinya untuk berkembang membentuk populasi sel kanker. Tahap kedua adalah promosi, dimana karsinogen atau faktor lain mengubah lingkungan untuk mendukung pertumbuhan sel yang mengalami mutasi. Sel yang mengalami mutasi akan berkembang menjadi kanker. Fase akhir pertumbuhan kanker adalah progresi, yaitu melibatkan perubahan genetik yang lebih jauh sehingga memicu peningkatan proliferasi sel (Dipiro *et al.*, 2008).

Terdapat dua kelompok utama gen yang terlibat dalam karsinogenesis, yaitu gen onkogen dan supresor tumor. Onkogen berasal dari gen normal, proto-onkogen, dan berperan penting dalam semua fase karsinogenesis. Proto-onkogen terdapat pada semua sel dan berfungsi sebagai regulator sel normal, termasuk siklus sel. Perubahan genetik proto-onkogen akan mengaktivasi onkogen. Perubahan genetik tersebut dapat disebabkan oleh agen karsinogenik, seperti radiasi, agen kimia (seperti obat atau hormon), atau virus (mutasi somatik), atau merupakan bawaan (mutasi *germ-line*). Saat teraktivasi, onkogen



diekspresikan secara berlebihan. Akibatnya, terjadi disregulasi pertumbuhan dan proliferasi sel normal sehingga meningkatkan transformasi kanker. Misalnya, famili *human epidermal growth factor receptor* (HER) mempunyai 4 anggota, yaitu ErbB-1, yang disebut sebagai *epidermal growth factor receptor* (EGFR), HER-2, HER-3, dan HER-4. Saat teraktivasi, reseptor tersebut akan memediasi proliferasi sel dan diferensiasi melalui aktivasi reseptor tirosin kinase intraseluler dan penurunan jalur signaling. Onkogen akan terekspresi berlebihan sehingga menyebabkan proliferasi seluler yang berlebihan, metastasis, dan angiogenesis pada kanker. Sedangkan, gen supresor tumor berperan dalam meregulasi dan menghambat pertumbuhan dan proliferasi sel yang abnormal. Hilangnya gen atau mutasi pada gen supresor tumor menyebabkan hilangnya kontrol pertumbuhan sel normal (Dipiro *et al.*, 2008).

Kelompok gen lain yang berperan dalam karsinogenesis adalah gen yang bertugas memperbaiki DNA. Fungsi normal gen tersebut adalah untuk memperbaiki DNA yang rusak akibat faktor lingkungan atau kesalahan pada DNA yang muncul saat replikasi. Kesalahan tersebut dapat menyebabkan mutasi sehingga terjadi aktivasi onkogen atau inaktivasi gen supresor tumor. Bila mutasi yang terjadi semakin meluas, maka akan terjadi peningkatan resiko transformasi kanker (Dipiro *et al.*, 2008).

Gen onkogen dan supresor tumor memberikan sinyal stimulasi dan inhibisi untuk meregulasi siklus sel. Sinyal tersebut diterima secara bersamaan oleh sistem disebut *cell-cycle clock*. Fungsi *clock* pada jaringan normal adalah untuk mengintegrasikan input sinyal dan untuk menentukan apakah siklus sel harus dilanjutkan. *Clock* terbentuk dari beberapa protein yang berinteraksi, yaitu *cyclins* dan *cyclin-dependent kinases*. Protein tersebut akan masuk ke dalam sel dan

terkespresi berlebihan pada beberapa kanker, termasuk kanker payudara (Dipiro *et al.*, 2008).

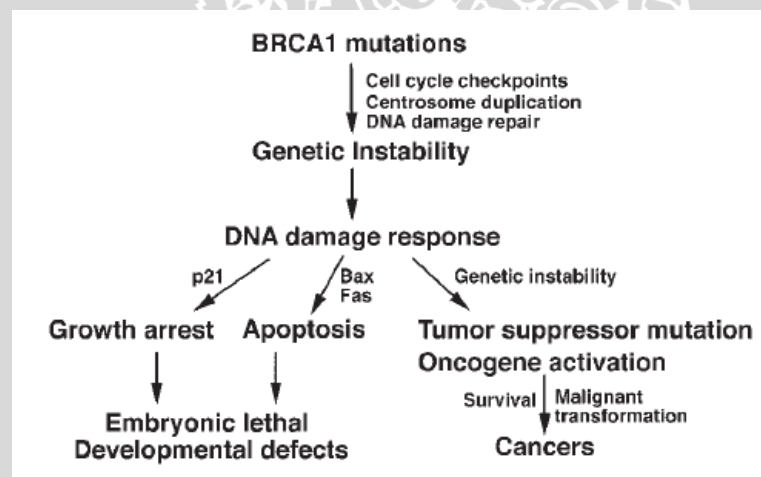
Saat terjadi kegagalan mekanisme regulator normal untuk pertumbuhan, sistem pertahanan akan teraktivasi, meliputi apoptosis dan penuaan sel. Apoptosis merupakan mekanisme normal kematian sel yang dibutuhkan untuk homeostasis jaringan. Proses tersebut diregulasi oleh gen onkogen dan supresor tumor, serta merupakan mekanisme kematian seluler setelah terjadi paparan agen sitotoksik. Ekspresi onkogen yang berlebihan menyebabkan terbentuknya sel '*immortal*', dimana akan meningkat saat kanker, misalnya, gen onkogen bcl-2. Proto-onkogen bcl-2 secara normal terletak pada kromosom 18. Translokasi proto-onkogen bcl-2 menuju kromosom 14 pada proksimitas gen immunoglobulin dengan rantai berat memicu ekspresi bcl-2 yang berlebihan, dimana apoptosis akan menurun dan menyebabkan sel terus berkembang (Dipiro *et al.*, 2008).

P53 merupakan regulator apoptosis. Penurunan jumlah p53 menyebabkan gangguan pada jalur apoptosis. Selain itu, telomer, segmen DNA yang terletak di ujung kromosom, juga terlibat dalam karsinogenesis. Telomer berfungsi untuk melindungi ujung DNA dari kerusakan. Pada setiap proses replikasi akan terjadi pemendekan rantai telomer sampai pada titik kritis, dengan demikian penuaan sel terjadi. Pada sel kanker, fungsi telomer dapat kembali seperti semula akibat ekspresi enzim telomerase yang berlebihan (Dipiro *et al.*, 2008).

Salah satu gen yang terlibat dalam kanker payudara BRCA1. BRCA1 merupakan protein yang memiliki banyak fungsi dan berinteraksi dengan beberapa protein lain yang terlibat dalam jalur biologi. BRCA1 terlibat dalam semua fase siklus sel dan meregulasi aktivitas selama proses siklus sel.



Defisiensi pada BRCA1, akan menyebabkan abnormalitas pada fase S *checkpoint*, G<sub>2</sub>/M *checkpoint*, dan *spindle checkpoint*. Abnormalitas pada *checkpoint* tersebut, bersama dengan abnormalitas pada duplikasi sentrosom dan perbaikan kerusakan DNA yang tidak sempurna, dapat menyebabkan ketidakstabilan genetik pada sel. Ketidakstabilan genetik pada sel tersebut, pada gilirannya akan menyebabkan respon fisiologis, seperti aktivasi sinyal ATM-Chk2-p53 yang timbul saat fase G<sub>1</sub>/S akibat peningkatan regulasi p21 dan apoptosis karena aktivasi sinyal pro-apoptosis. Tidak adanya BRCA1 akan menyebabkan perubahan genetik yang lebih jauh, termasuk mutasi gen supresor tumor dan aktivasi onkogen, dimana akan menyebabkan kerusakan sel yang parah dan memicu kanker payudara (Gambar 2.1) (Deng, 2006).



Gambar 2.1 Mutasi BRCA1 dan perkembangan kanker (Deng, 2006)

## 2.1.5 Terapi

### 2.1.5.1 Pembedahan

Pembedahan bertujuan untuk menghilangkan tumor payudara. Pembedahan payudara meliputi *breast-conserving surgery* dan *mastectomy*. Selain itu, pembedahan bertujuan untuk memeriksa penyebaran kanker melalui



nodus limfe yang terletak di bawah lengan, yaitu dengan *sentinel lymph node biopsy* dan *axillary lymph node dissection* (ACS, 2013c).

#### 2.1.5.1.1 **Breast-conserving Surgery**

*Breast-conserving surgery* (BCS) juga disebut *partial mastectomy*. Terapi ini hanya untuk menghilangkan bagian payudara yang terkena kanker. BCS meliputi *lumpectomy* dan *quadrantectomy*. *Lumpectomy* merupakan pembedahan, yang hanya menghilangkan benjolan pada payudara dan daerah sekitar jaringan normal. Sedangkan, *quadrantectomy* merupakan pembedahan yang bertujuan untuk menghilangkan jaringan payudara lebih banyak daripada *lumpectomy*, yaitu seperempat bagian payudara. Setelah pembedahan tersebut, terapi radiasi diberikan. Namun, bila diberikan kemoterapi adjuvan, maka radiasi ditunda sampai kemoterapi selesai (ACS, 2013c).

Efek samping yang mungkin terjadi setelah dilakukan pembedahan antara lain, nyeri, bengkak sementara, lembek, dan adanya jaringan parut yang keras di lokasi bedah. Selain itu, juga memungkinkan terjadinya perdarahan dan infeksi di lokasi bedah (ACS, 2013c).

#### 2.1.5.1.2 **Mastectomy**

*Mastectomy* merupakan pembedahan yang bertujuan untuk menghilangkan semua bagian payudara. Semua jaringan payudara dihilangkan, bahkan jaringan di sekitar payudara juga dihilangkan. Terdapat empat macam prosedur *mastectomy* antara lain (ACS, 2013c),

- 1) *Simple mastectomy*, yaitu penghilangan semua bagian payudara, termasuk puting, namun tidak menghilangkan nodul limfe di bawah lengan atau jaringan otot dalam payudara.

- 2) *Skin-sparing mastectomy*, yaitu penghilangan jaringan payudara, termasuk putting, namun tanpa menghilangkan kulit payudara.
- 3) *Modified radical mastectomy*, yaitu *mastectomy* sederhana dan penghilangan nodus limfe aksila (dibawah lengan).
- 4) *Radical mastectomy*, yaitu penghilangan semua bagian payudara, nodus limfe aksila, dan otot pectoral di bawah payudara.

Efek samping yang mungkin terjadi setelah dilakukan *mastectomy* adalah perubahan bentuk payudara, infeksi, hematoma, dan seroma. Bila nodus limfe aksila juga dihilangkan, maka efek samping lain yang mungkin terjadi (ACS, 2013c).

#### 2.1.5.1.3 *Lymph Node Surgery*

*Lymph node surgery* adalah prosedur untuk menentukan persebaran kanker payudara menuju nodus limfe aksila, satu atau lebih nodus limfe tersebut diambil dan diperiksa di bawah mikroskop. Prosedur ini penting dalam penentuan *stage* dan terapi kanker payudara. Prosedur ini meliputi (ACS, 2013c),

- 1) *Axillary lymph node dissection (ALND)*, yaitu penghilangan 10-40 nodus limfe dari area aksila dan diperiksa persebaran kanker.
- 2) *Sentinel lymph node biopsy (SLNB)*, yaitu prosedur untuk memeriksa nodus limfe tanpa pengambilan nodus limfe di area aksila.

Efek samping yang mungkin terjadi setelah dilakukan prosedur ini adalah nyeri, bengkak, perdarahan, dan infeksi. Efek jangka panjang yang mungkin terjadi adalah *lymphedema* (bengkak) pada lengan (ACS, 2013c).



#### 2.1.5.1.4 *Reconstructive Surgery*

*Reconstructive surgery* adalah pembentukan ulang payudara. Prosedur ini dilakukan untuk mengembalikan bentuk semula payudara setelah pembedahan. Terdapat beberapa tipe *reconstructive surgery*. Prosedur ini menggunakan implan *saline (salt water)* atau silikon, namun ada pula yang menggunakan jaringan lain pada tubuh (ACS, 2013c).

#### 2.1.5.2 Radiasi

Terapi radiasi merupakan terapi dengan sinar atau partikel berenergi tinggi untuk menghancurkan sel kanker. Radiasi untuk payudara biasanya diberikan setelah BCS untuk membantu menurunkan kekambuhan kanker pada payudara atau nodus limfe sekitar payudara. Radiasi juga direkomendasikan setelah *mastectomy* pada pasien dengan kanker lebih dari 5 cm, atau ketika kanker ditemukan di nodus limfe. Selain itu, radiasi digunakan untuk terapi kanker yang sudah menyebar ke area lain, seperti pada tulang atau otak (ACS, 2013d).

Terdapat 2 macam terapi radiasi, yaitu *external beam radiation* dan *brachytherapy*. *External beam radiation* merupakan radiasi yang paling sering dilakukan untuk wanita dengan kanker payudara. Biasanya, radiasi payudara dilakukan 5 hari tiap minggu selama 5-6 minggu. Efek samping jangka pendek yang mungkin terjadi setelah dilakukan radiasi ini adalah bengkak dan terasa berat pada payudara, perubahan kulit seperti terbakar pada area yang dilakukan radiasi, dan lemas. Sedangkan, *brachytherapy* adalah terapi radiasi yang sering disebut *internal radiation*. Radiasi ini dibedakan menjadi 2 tipe, yaitu (ACS, 2013d) :



- 1) *Interstitial brachytherapy*, yaitu radiasi dengan bantuan kateter yang dimasukkan dalam payudara selama beberapa hari, setelah dilakukan radiasi.
- 2) *Intracavitary brachytherapy*, yaitu radiasi *brachytherapy* yang paling sering dilakukan pada pasien dengan kanker payudara dan dianggap sebagai bentuk radiasi payudara parsial yang cepat.

### 2.1.5.3 Kemoterapi

Kemoterapi merupakan terapi menggunakan obat untuk membunuh kanker yang dapat diberikan secara intravena atau oral. Obat beraksi melalui peredaran darah untuk mencapai sel kanker pada bagian tubuh. Kemo ditujukan pada siklus sel, dimana setiap periode terapi diikuti dengan periode perbaikan. Terapi ini biasanya diberikan selama beberapa bulan (ACS, 2013e).

Kemoterapi direkomendasikan pada beberapa kondisi, yaitu setelah pembedahan, sebagai kemoterapi adjuvant, dan sebelum pembedahan, sebagai kemoterapi neoadjuvan. Selain itu, kemo juga dapat diberikan untuk terapi utama terhadap kanker yang sudah menyebar di luar daerah payudara dan di bawah lengan, serta saat didiagnosa atau setelah terapi inisial. Durasi terapi bergantung pada kekuatan kanker dan toleransi terhadap terapi (ACS, 2013e).

Pada sebagian besar kasus, kemo lebih efektif diberikan sebagai terapi kombinasi daripada terapi tunggal. Obat kemo yang paling sering digunakan untuk kanker payudara adalah *anthracyclines* (seperti doxorubicin/Adriamycin® dan *Taxanes* (seperti paclitaxel/Taxol®). Obat tersebut dapat dikombinasikan dengan obat lain, seperti *fluorouracil* (5-FU) dan *cyclophosphamide* (ACS, 2013e).

Mekanisme obat-obat tersebut berbeda-beda. *Anthracyclines* merupakan agen DNA *intercalating* yang mengikat DNA. Agen ini mengikat sekuen DNA tertentu, membentuk kompleks topoisomerase-DNA dan menyebabkan pecahnya DNA rantai ganda (Preobrazhenskaya, *et al.*, 2006). *Taxane* merupakan agen sitotoksik diterpen. *Taxane* mampu menekan dan menghambat pertumbuhan, diferensiasi, dan proliferasi kanker. *Taxane* mampu mengikat mikrotubul dan menstabilkannya, menghambat depolimerisasi, dan mengganggu fase G2/M sehingga dapat memblokir siklus sel saat mitosis, akibatnya akan menginduksi program kematian sel (Fauzee *et al.*, 2011). *Fluorouracil* merupakan anggota golongan antimetabolite. *Fluorouracil* mampu mengganggu sel dalam proses pembentukan DNA dan RNA sehingga dapat menghentikan pertumbuhan sel kanker (ACS, 2012). Sedangkan, *cyclophosphamide* merupakan agen pengalkilasi DNA dan protein yang memiliki aktivitas spektrum luas melawan kanker, termasuk kanker payudara (Singh *et al.*, 2009).

Beberapa obat kombinasi yang paling sering digunakan untuk kanker payudara awal sebagai berikut (ACS, 2013e),

- 1) CAF (atau FAC) : *cyclophosphamide*, *doxorubicin* (Adriamycin), dan 5-FU
- 2) TAC : *docetaxel* (Taxotere), *doxorubicin* (Adriamycin), dan *cyclophosphamide*
- 3) AC → T : *doxorubicin* (Adriamycin) dan *cyclophosphamide*, diikuti dengan pemberian *paclitaxel* (Taxol) atau *docetaxel* (Taxotere).
- 4) FEC : → T, 5-FU, *epirubicin*, dan *cyclophosphamide*, diikuti dengan pemberian *docetaxel* (Taxotere) atau *paclitaxel* (Taxol)
- 5) TC : *docetaxel* (Taxotere) dan *cyclophosphamide*

6) TCH : *docetaxel*, *carboplatin*, dan *trastuzumab* (Herceptin) untuk pasien yang positif terhadap HER2/neu

Efek samping yang mungkin terjadi setelah penggunaan kemoterapi bergantung pada tipe obat, jumlah yang dikonsumsi, dan durasi terapi. Efek samping yang paling sering terjadi adalah rambut rontok, sakit pada mulut, penurunan atau peningkatan nafsu makan, mual dan muntah, dan penurunan jumlah sel darah. Kemo dapat mempengaruhi pembentukan sel darah pada sum-sum tulang belakang sehingga dapat memicu peningkatan resiko infeksi (karena penurunan jumlah sel darah putih), rentan terhadap perdarahan atau luka (karena penurunan jumlah platelet darah), dan lemas (karena penurunan jumlah sel darah merah). Efek samping tersebut biasanya hanya jangka pendek dan berhenti setelah penghentian terapi. Pada remaja, perubahan periode menstruasi sering terjadi. Selain itu, *prematuur menopause* (tidak mengalami periode menstruasi) dan mandul dapat terjadi, dan bahkan permanen (ACS, 2013e).

#### 2.1.5.4 Terapi Hormonal

Terapi hormonal termasuk dalam terapi sistemik. Terapi ini sering digunakan sebagai terapi adjuvan untuk membantu menurunkan resiko kekambuhan kanker setelah pembedahan, namun juga dapat digunakan sebagai terapi neoadjuvan. Selain itu, juga dapat digunakan untuk mengobati kanker yang telah menyebar atau yang kambuh setelah diberikan terapi lain (ACS, 2013f).

Obat yang digunakan untuk memblokir estrogen antara lain (ACS, 2013f),



- 1) Tamoxifen, yaitu dengan memblok reseptor estrogen pada sel kanker payudara. Tamoxifen menghentikan ikatan antara estrogen dengan reseptornya dan memerintahkan sel untuk tumbuh dan membelah. Tamoxifen disebut sebagai *selective estrogen receptor modulator (SERM)* karena aksinya sebagai estrogen pada jaringan lain, seperti uterus dan tulang, namun sebagai antiestrogen pada sel payudara. Namun, pemberian obat ini dapat meningkatkan resiko kanker uterus pada wanita yang telah mengalami menopause, dan serangan jantung. Obat ini diberikan melalui rute oral.
- 2) Toremifene (Fareston®), aksinya mirip dengan tamoxifen. Toremifene juga merupakan SERM, namun hanya diperbolehkan untuk mengobati kanker payudara yang telah bermetastase.
- 3) Fulvestrant (Faslodex®), merupakan obat yang memblok reseptor estrogen dan mengeliminasi secara temporer. Fulvestran bukanlah SERM, namun beraksi seperti antiestrogen pada tubuh. Fulvestrant digunakan untuk mengobati kanker payudara yang telah bermetastase, biasanya setelah penggunaan obat hormonal berhenti bekerja. Obat ini diberikan melalui injeksi pada pantat. Pada bulan pertama, injeksi diberikan 2 minggu secara terpisah. Setelah itu, diberikan 1 kali injeksi tiap bulan. Efek samping yang paling sering muncul adalah *hot flashes*, keringat saat malam, mual, dan lemas.

Selain itu, ada pula terapi untuk menurunkan level estrogen, yaitu (ACS, 2013f) :

- 1) *Aromatase inhibitors (AIs)*, menghentikan produksi estrogen pada wanita post-menopause. Als bekerja dengan memblok enzim pada jaringan lemak

yang bertanggung jawab terhadap pembentukan estrogen pada wanita post-menopause. Penggunaan obat ini, secara tunggal ataupun setelah tamoxifen, dapat menurunkan resiko kekambuhan kanker bila dibandingkan dengan hanya menggunakan tamoxifen tunggal selama 5 tahun.

- 2) *Ovarian ablation*, dilakukan dengan penghilangan ovarium dengan cara pembedahan. Operasi ini disebut *oophorectomy*. Biasanya, *ovarian ablation* dilakukan menggunakan obat analog *lutening hormone-releasing hormone* (LHRH), seperti *goserelin* (Zoladex®) atau *leuprolide* (Lupron®). Obat tersebut menghentikan sinyal tubuh terhadap ovarium untuk memproduksi estrogen.

#### 2.1.5.5 Targeted Therapy

Obat dengan target tertentu bekerja dengan mekanisme yang berbeda dengan obat kemoterapi standar, dan biasanya memiliki efek samping yang lebih rendah. Pada kanker payudara yang terjadi peningkatan level protein HER2/neu akan terjadi perkembangan dan penyebaran kanker payudara agresif bila tanpa terapi khusus. Beberapa obat dikembangkan untuk protein tersebut. Namun, tidak ada satupun dari obat tersebut aman digunakan saat masa kehamilan karena dapat menyebabkan kematian pada janin. Beberapa obat dengan target protein HER2 antara lain (ACS, 2013g),

- 1) Trastuzumab (Herceptin), yaitu obat yang dikenal sebagai antibodi monoklonal yang sangat spesifik terhadap protein sistem imun. Obat ini dapat berikatan dengan HER2 dan membantu memperlambat pertumbuhan sel kanker dengan level HER2 yang tinggi sehingga dapat menstimulasi sistem imun untuk menyerang sel kanker secara efektif. Obat ini diberikan



secara intravena, biasanya sekali dalam seminggu atau dengan dosis yang lebih besar yang diberikan tiap 3 minggu.

- 2) Ado-trastuzumab emtansine (TDM-1, Kadcyla™), yaitu obat yang dikenal sebagai konjugasi obat antibodi yang dibuat sama seperti antibodi monoklonal DM-1. Pada tipe obat ini, antibodi bekerja membantu obat kemo langsung menuju sel kanker. Obat ini diberikan tunggal (tanpa kemo) untuk mengobati kanker payudara yang parah, diberikan secara intravena setiap 3 minggu.
- 3) Pertuzumab (Perjeta®), sama seperti trastuzumab, sebagai antibodi monoklonal yang mengikat protein HER2. Obat ini diberikan secara infus menuju vena setiap 3 minggu.
- 4) Lapatinib (Tykerb), merupakan obat yang menargetkan pada protein HER2. Obat ini diberikan sebagai pil untuk wanita dengan kanker payudara positif HER2 yang tidak adekuat menggunakan kemo dan trastuzumab.

Selain target protein HER2, ada obat yang digunakan untuk target faktor pertumbuhan endotel vaskuler, yaitu Bevacizumab (Avastin®). Tumor perlu tumbuh dan mempertahankan pembuluh darah baru untuk tumbuh. Obat ini ditargetkan untuk pembuluh darah sehingga membantu untuk melawan kanker. Bevacizumab diberikan secara intravena, biasanya diberikan sebagai kombinasi dengan kemo (ACS, 2013g).

## 2.2 Sel MCF-7

Sel MCF-7 adalah sel yang umum digunakan sebagai model untuk penelitian kanker payudara (Hardouin *et al.*, 2006). Sel MCF-7 memiliki bentuk yang terbaik dari semua jenis sel kanker payudara manusia. Sel MCF-7



menyerupai sel epitel yang tumbuh secara *monolayer* dan diambil dari tempat efusi pleural metastasis kanker payudara. Biakan sel MCF-7 memiliki beberapa karakteristik pada epitel mamari yang berbeda, termasuk kemampuannya untuk memproduksi estradiol via reseptor sitoplasma dan kemampuannya untuk membentuk *dome*. Dalam pertumbuhannya, sel ini akan membentuk kultur selapis pada labu kultur dan ditumbuhkan dalam medium *Dubecco's Modified Eagle's Mediu, Merck* (DMEM) (Widowati dan Harfia, 2009).

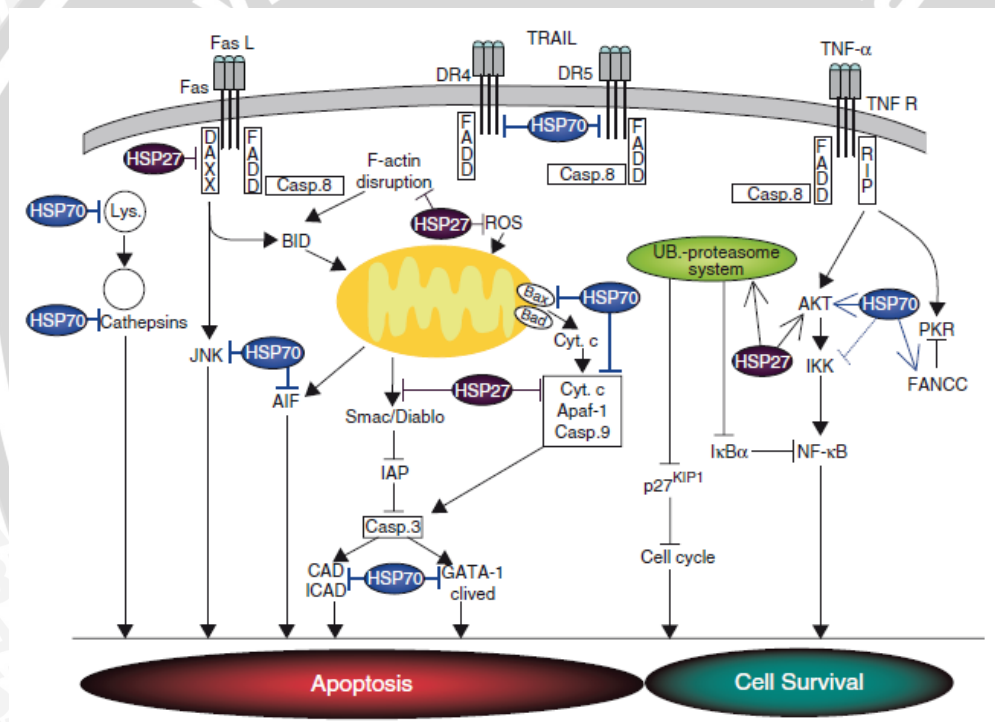
### 2.3 Heat shock protein (Hsp27)

#### 2.3.1 Fungsi Normal Hsp27

*Heat shock protein 27* (Hsp27) merupakan anggota famili *heat shock protein* (Hsp) dengan berat molekul yang kecil (12-43 kDa). Hsp27 muncul sebagai respon terhadap *heat shock* dan kondisi stres seluler sebagai protein yang akan memicu kerusakan protein (Vidyasagar *et al.*, 2012). Hsp27 berperan dalam peningkatan tumorigenesitas, resisten terhadap terapi, dan inhibisi apoptosis (Chen *et al.*, 2012). Hsp27 secara konstitutif tereksprei dalam sel dan jaringan dalam jumlah yang rendah (Kanagasabai *et al.*, 2011).

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 melalui kemampuannya sebagai antioksidan untuk mempertahankan level glutation dalam bentuk yang tidak teroksidasi sehingga dapat menurunkan ROS dan menetralkan efek toksik protein yang teroksidasi; 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 dapat meregulasi aktivasi caspase yang diinduksi oleh sitokrom c pada tahap yang berbeda, pada level pre-mitokondria dengan menghambat rilis sitokrom c secara tidak langsung melalui aksinya terhadap F-actin, Bid, atau ROS dan pada level post-mitokondria melalui sekuestrasi sitokrom c sitosolik. Hsp27 juga dapat mempengaruhi apoptosis dengan meningkatkan ubiquitinasi/degradasi protein seperti I- $\kappa$ B $\alpha$  atau p27<sup>kip1</sup> dibawah kondisi stress (**Gambar 2.2**) (Rérole *et al.*,2010).



**Gambar 2.2** Peran Hsp27 terhadap apoptosis dan kelangsungan hidup sel (Rérole *et al.*,2010)

Hsp27 juga berpengaruh pada level reseptor kematian karena stimulasi CD95/Fas. Hsp27 yang terfosforilasi secara langsung berinteraksi dengan Daxx, yang menghubungkan signaling Fas terhadap protein kinase Ask1 yang memediasi kematian sel oleh caspase (**Gambar 2.2**) (Rérole *et al.*,2010).



Akibatnya, DAXX tidak akan berikatan dengan Ask1 sehingga terjadi hambatan apoptosis (Vidyasagar *et al.*, 2012).

Kemampuan sitoproteksi Hsp27 bergantung pada kemampuannya untuk meningkatkan degradasi protein proteasomal tertentu (Rérole, *et al.*, 2010), seperti I- $\kappa$ B $\alpha$  (Kanagasabai *et al.*, 2010), dibawah kondisi stres. Dua target protein Hsp27 adalah NF- $\kappa$ B *inhibitor* I- $\kappa$ B $\alpha$  dan *cyclin-dependent kinase inhibitor* p27<sup>kip1</sup>. NF- $\kappa$ B terlibat dalam ekspresi protein antiapoptosis, seperti Bcl-2, Bcl-xl and c-IAPs (**Gambar 2.2**) (Rérole *et al.*, 2010), dimana ekspresi protein antiapoptosis tersebut akan meningkat (Kanagasabai *et al.*, 2010). Dibawah kondisi stres, Hsp27 juga menstimulasi ubiquinasi/degradasi p27<sup>kip1</sup>. Akibatnya, sel tidak berakumulasi pada siklus sel fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, namun pada fase S. Oleh karena itu, sel yang mengekspresikan Hsp27 secara berlebihan akan lebih siap untuk memulai kembali proliferasi saat kondisi stres sudah tidak terjadi (Rérole *et al.*, 2010).

### 2.3.2 Fungsi Hsp27 pada Sel Kanker

Hsp27 telah dilaporkan terkspresi berlebihan pada kanker payudara, ovarium, kepala dan leher (Chen *et al.*, 2012). Ekspresi Hsp27 yang berlebihan dapat menghambat apoptosis dan mencegah aktivasi *caspase* (Rérole *et al.*, 2010). Peningkatan level protein Hsp27 pada jaringan kanker dapat disebabkan karena mutasi pada faktor transkripsi, seperti *heat shock transcriptional factor-1* (HSF-1). HSF-1 merupakan faktor yang berperan dalam transkripsi yang berhubungan dengan kondisi stres dan aktivitas translasi pada sel eukariotik melalui ikatan dengan *heat shock element* (HSE). HSF-1 juga dapat teraktivasi sebagai respon terhadap stres oksidatif, kerusakan DNA, dan



stimulus stres lain, serta berperan dalam proses signaling sel yang diinduksi oleh kondisi stres (Kanagasabai *et al.*, 2011).

Selain itu, peningkatan transkripsi Hsp pada sel tumor disebabkan karena penurunan fungsi p53 dan juga tingginya ekspresi proto-onkogen, seperti *HER* dan *c-Myc* dan sangat penting terhadap tumorigenesis. Hsp terekspresi dalam level yang tinggi untuk mendukung pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel tumor. Hsp27 terutama terlibat dalam perlindungan terhadap program kematian sel melalui inhibisi apoptosis jalur *caspase* (Vidyasagar, *et al.* 2012).

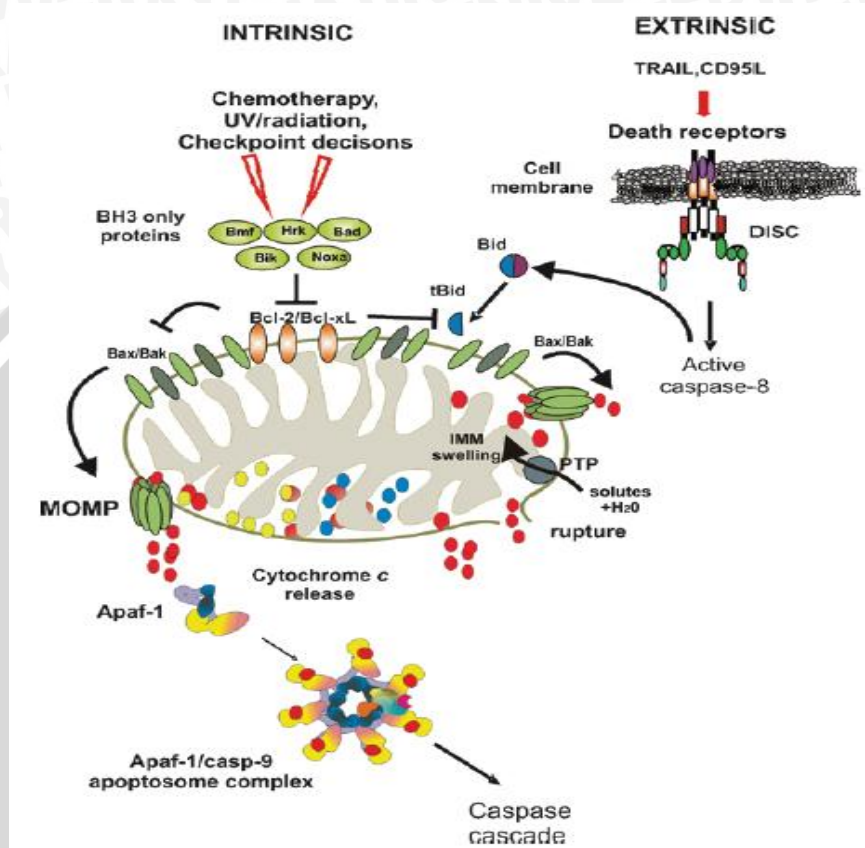
## 2.4 Apoptosis

### 2.4.1 Definisi

Program kematian sel merupakan proses untuk perkembangan embrionik dan menjaga homeostasis jaringan pada organisme multiseluler. Apoptosis, merupakan jalur program kematian sel yang paling dikenal, ditandai oleh perubahan biokimia dan morfologi yang spesifik, termasuk kondensasi kromatin, penyusutan sel, penonjolan dan pecahnya membran, fragmentasi DNA, dan pembentukan badan apoptosis, yang kemudian ditangkap oleh makrofag (Cavallucci dan Marcello, 2010).

Berdasarkan aktivasi jalur kematian sel, *caspase* dibagi menjadi dua kelompok utama : *executioner caspase* (*caspase-3*, *caspase -7*, dan *caspase -6*) dan *initiator caspase* (*caspase-8*, *caspase -9*, dan *caspase -10*). Dibawah stimulus apoptosis yang berbeda, terdapat dua jalur utama kematian sel yang dimediasi *caspase*, yaitu jalur ekstrinsik (jalur yang dimediasi oleh reseptor kematian) yang berperan penting dalam menjaga homeostasis jaringan, dan jalur

intrinsik (jalur melalui mitokondria) yang berperan dalam merespon gangguan ekstraseluler dan intraseluler (**Gambar 2.3**) (Cavallucci dan Marcello, 2010).



**Gambar 2.3 Jalur Signaling Apoptosis (Cavallucci dan Marcello, 2010)**

Salah satu faktor transkripsi yang terlibat dalam jalur apoptosis adalah *nuclear faktor*  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B). NF $\kappa$ B dapat mengaktivasi inhibitorynya sendiri, I $\kappa$ B, serta gen pro-apoptosis dan anti-apoptosis. NF $\kappa$ B dapat mengaktivasi transkripsi gen pengkode *inhibitor of apoptosis protein* (IAP), yang pada gilirannya akan menurunkan aktivitas *caspase* yang merupakan inti jalur apoptosis (Chaves *et al.*, 2009).

Jalur NF $\kappa$ B diinduksi oleh stimulus *cytokine tumor necrosis factor*  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Ikatan antara TNF $\alpha$  dengan reseptor kematian, TNFR1, akan membentuk kompleks yang akan mengaktivasi NF $\kappa$ B. Selanjutnya, kompleks



kedua terbentuk, akibatnya akan terjadi aktivasi *caspase-8* sehingga akan mengaktivasi proses apoptosis. Sinyal yang sama oleh  $\text{TNF}\alpha$  dapat mentebakkan dua jalur yang berbeda, yaitu jalur *caspase* pro-apoptosis dan anti-apoptosis  $\text{NF}\kappa\text{B}$ - I $\kappa\text{B}$ -IAP. Kedua jalur tersebut akan membentuk kompleks yang bertugas untuk memutuskan terjadinya inisiasi program kematian sel atau *survival cell* (Chaves *et al.*, 2009).

Aktivasi  $\text{NF}\kappa\text{B}$  juga dapat distimulasi oleh *toll-like receptors 4* (TLR4) (Maeda, 2010), reseptor yang berperan dalam mekanisme pertahanan respon imun alamiah dan dapat menginduksi respon imun bawaan terhadap infeksi mikroba dan kerusakan jaringan oleh kanker (Sato *et al.*, 2009). Aktivasi sinyal TLR diinduksi oleh nitrit oksida sintase (iNOS2) dan *cyclooxygenase* (COX2) (Ridnour *et al.*, 2012). Aktivasi tersebut menyebabkan mutasi DNA dan translokasi kromosom yang abnormal. TLR bergantung pada protein adaptor, *MyD88-dependent*, untuk menghasilkan respon inflamasi (Wang *et al.*, 2010), dimana protein tersebut diinduksi oleh Hsp70 ekstraseluler (Asea *et al.*, 2002). Proses signaling *MyD88* melibatkan aktivasi  $\text{NF}\kappa\text{B}$  sehingga memicu produksi sitokin pro-inflamasi. Aktivasi sinyal TLR4 diketahui dapat menghambat apoptosis sel kanker (Wang *et al.*, 2010).

Apoptosis juga dapat dipengaruhi oleh Hsp70. Peningkatan ekspresi Hsp70 pada kanker payudara diakibatkan karena peningkatan HSF-1 yang berlebihan. Akibatnya, Hsp70 yang terekspresi secara berlebihan di intraseluler akan menghambat Apaf-1 dan *caspase-9* sehingga apoptosis sel kanker payudara terhambat (Rérole *et al.*, 2010).



## 2.4.2 Jalur Apoptosis

### 2.4.2.1 Jalur Ekstrinsik

Jalur ekstrinsik diaktivasi oleh stimulasi reseptor kematian (termasuk Fas, TNFR1, DR4, dan DR5) setelah berikatan dengan ligan kematian (FasL, TNF $\alpha$ , TRAIL, TNFSF10). Reseptor kematian digolongkan berdasarkan interaksi *homotypic*, yaitu domain kematian (DD) dan domain efektor kematian (DED). Ikatan ligan, seperti FasL, dengan reseptor kematian akan mengatur ulang dan menstimulasi pengikatan protein adaptor, seperti domain kematian yang berhubungan dengan Fas (FADD). Protein adaptor FADD mempunyai dua interaksi yaitu domain DD yang berinteraksi dengan domain DD reseptor Fas, dan domain DED yang memfasilitasi pengikatan *procaspase-8* (atau *procaspase-10*) dan pembentukan kompleks signaling yang menginduksi kematian (DISC). Pembentukan DISC memicu aktivasi *caspace-8* yang akan membelah dan mengaktifasi *downstream effector caspace-3* (Gambar 2.3) (Cavallucci dan Marcello, 2010).

Pada beberapa tipe sel, *mitochondrial amplification loop* dibutuhkan saat pembelahan anggota famili Bid, Bcl-2 pro-apoptosis, yang dimediasi oleh *caspace-8* menyebabkan translokasi menuju mitokondria, yang selanjutnya akan menginduksi rilis sitokrom c. Rilis sitokrom c dari mitokondria merupakan tahap awal jalur intrinsik dan menghasilkan aktivitas *caspace* untuk membunuh sel. Sel lain (sel yang responsif terhadap Fas) mengaktifasi *caspace-8* untuk secara langsung mengaktifasi *caspace-3* dan *caspace-7* dan meningkatkan inhibisi Bcl-2 dari signaling mitokondria (Gambar 2.3) (Cavallucci dan Marcello, 2010).

#### 2.4.2.2 Jalur Intrinsik

Jalur ekstrinsik memediasi apoptosis melalui sinyal kematian yang spesifik terhadap membran plasma, sedangkan jalur intrinsik memediasi apoptosis melalui mitokondria yang diaktivasi oleh stimulus ekstraseluler dan intraseluler, termasuk toksin, radiasi, hipoksia, stres oksidatif, reperfusion iskemi, dan kerusakan DNA (Cavallucci dan Marcello, 2010).

Permeabilisasi membran luar mitokondria (MOMP) terlibat dalam jalur apoptosis intrinsik. Anggota famili B *lymphocytic-leukemia proto-oncogene* (Bcl-2) berperan penting dalam MOMP. Protein famili Bcl-2 digolongkan menjadi dua, yaitu protein pro-apoptosis (Bax, Bak, dan lain-lain) dan anti-apoptosis (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, dan lain-lain). Saat terjadi stimulus apoptosis, Bax dan Bak mengalami perubahan konformasi, oligomerisasi dan translokasi menuju mitokondria, kemudian akan memicu MOMP melalui destabilisasi *lipid bilayer*, membentuk pori atau berinteraksi dengan kanal membran (Gambar 2.3) (Cavallucci dan Marcello, 2010).

MOMP menyebabkan rilis sitokrom c menuju sitoplasma, dimana, bila terdapat dATP, maka akan terjadi induksi pembentukan apoptosom, kompleks makromolekuler yang mengandung *Apoptotic protease activation factor-1* (Apaf-1). Kompleks tersebut mengikat dan memicu aktivasi proteolitik *procaspase-9*. *Caspase-9* yang matang akan mengikat apoptosom sehingga akan mengaktivasi *caspase-3* dan/atau *caspase -7* (Gambar 2.3) (Cavallucci dan Marcello, 2010).

Saat sitokrom c rilis, induksi MOMP memicu rilis molekul pro-apoptosis esensial lain menuju sitosol, seperti Smac/Diablo dan Omi/AtrA2 yang dapat meningkatkan eksekusi apoptosis melalui inaktivasi *Inhibitory Apoptotic Protein* (IAPs). Dibawah kondisi normal, *caspase* dihambat oleh IAPs. IAPs, protein XIAP



(*X-linked inhibitor of apoptosis*), akan mengikat bentuk aktif caspase-3, caspase -7 dan caspase -9 dan secara langsung menghambat aktivitas proteolitiknya (Gambar 2.3) (Cavallucci dan Marcello, 2010).

## 2.5 Daun Kelor (*Moringa oleifera*)



Gambar 2.4 Daun Kelor (Price, 2007)

### 2.5.1 Taksonomi

#### 2.5.1.1 Klasifikasi

Klasifikasi kelor sebagai berikut (Paliwal *et al.*, 2011),

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Orde	: Viales
Famili	: Moringaceae
Genus	: Moringa
Spesies	: <i>Moringa oleifera</i>



### 2.5.1.2 Nama Umum

Nama umum kelor sebagai berikut (Porcher *et al.*, 2008),

India	: Munga ara
Filipina	: Kalungai
Thailand	: Ma rum
Vietnam	: Chum Ngay
Inggris	: Horseradish tree, Drumstick tree
Indonesia	: Kelor

### 2.5.2 Morfologi

Kelor merupakan pohon meranggas yang dapat tumbuh dengan tinggi mencapai 15 meter, namun biasanya hanya tumbuh dengan tinggi kurang dari 10 meter. Kelor memiliki akar bawah tanah yang besar dan biasanya memiliki batang utama tunggal dengan mahkota yang lebar, terbuka dan berbentuk payung. Diameter batang sekitar 10-45 cm dan tertutup oleh kulit berwarna abu-abu pucat, namun terkadang diameter batang mencapai 60 cm. Struktur kayunya lembut dan tekstur kulit batang bervariasi dari halus sampai kasar, namun biasanya tidak pecah-pecah dan mengeluarkan eksudat putih-kemerahan ketika rusak. Batang mudanya halus dan tunas muda berwarna kehijauan atau keunguan (Navle dan Steve, 2010).

Daun kelor tumbuh pada tangkai sepanjang 4-15 cm. Daun berbentuk *tripinnate* dengan panjang sekitar 25-60 cm atau 6,5 cm dengan lebar 90 cm. Daun kelor membentuk jaringan di dasar tangkai dan lembaran daun yang dapat mengeluarkan cairan bening atau berwarna kuning. Daun kelor memiliki 5-11 cabang utama (*pinnae*) yang cembung. Masing-masing cabang menempel pada

tangkai sepanjang 1-3 cm dan memiliki 5-11 cabang yang lebih kecil (*pinnules*). Cabang-cabang yang lebih kecil memiliki tangkai (*petiolules*) dengan panjang 4-8 mm dan ditempeli oleh 3-13 daun (Navle dan Steve, 2010).

Daun kelor berbentuk bulat telur, elips, atau lonjong dengan panjang 10-24 mm dan lebar 5-18 mm. Lembaran daun pada tiap tangkai biasanya berbentuk *obovate* dan sedikit lebih besar. Lembaran daun tersebut sebagian *tomentose* hingga *puberulous* saat muda (Navle dan Steve, 2010).

Bunga kelor berwarna putih hingga krem, berbau harum, dan mempunyai panjang sekitar 2,5 cm. Bunga kelor menempel pada tangkai sepanjang 12-21 mm dan kuncup bunga berbentuk bulat telur. Setiap bunga memiliki 5 sepal seperti kelopak dan 5 kelopak. Bunga kelor muncul sepanjang tahun (Navle dan Steve, 2010).

Buah kelor berbentuk kapsul panjang dengan panjang 18-50 cm, biasanya 90 cm, dan lebar 1-3 cm. Buah kelor berwarna hijau dan *tomentose* saat muda, tetapi akan berubah warna menjadi coklat pucat saat dewasa. Biji kelor sekitar 20 pada setiap buah. Biji kelor berwarna coklat gelap atau kehitaman (Navle dan Steve, 2010).

### 2.5.3 Habitat

Kelor dapat beradaptasi di daerah tropis dan subtropis. Produksi daun dan buah kelor membutuhkan temperatur rata-rata harian 25-30°C, curah hujan 1000-2000 mm, radiasi matahari yang tinggi, dan tanah dengan pengairan yang baik. Kelor tumbuh lambat secara signifikan pada temperature dibawah 20°C. Kelor beradaptasi baik pada berbagai macam tanah dan rentang pH (4.5-9),

namun lebih dipilih tanah dengan pengairan baik dan rentang pH normal (Paliwal *et al.*, 2011).

#### 2.5.4 Persebaran

Kelor merupakan tanaman asli di bukit kaki gunung Himalaya (India/Bangladesh). Sebagai tanaman komersial, kelor dibudidaya secara ekstensif di India dan sebagian Afrika. Kelor banyak ditemukan di wilayah selatan dan Asia selatan . Saat ini, kelor banyak dibudidaya di Afrika, Amerika Selatan dan Tengah, Sri Lanka, India, Mexico, Malaysia, Indonesia, dan Afrika (Paliwal *et al.*, 2011).

#### 2.5.5 Khasiat

Kelor disebut '*miracle vegetable*' karena memiliki fungsi sebagai obat dan makanan. Kelor memiliki nilai terapi dan farmakologi yang tinggi sehingga bila dikonsumsi secara regular dapat menurunkan resiko penyakit degeneratif. Kelor dipercaya dapat mengobati asites, reumatik, gigitan berbisa, penyakit jantung, inflamasi, penyakit liver, kanker, penyakit hematologi, penyakit hepar, dan penyakit renal (Paliwal *et al.*, 2011).

Kelor digunakan sebagai obat tradisional selama berabad-abad digunakan untuk mengobati infeksi kulit, anemia, kecemasan, asma, bronchitis, katarak, kolera, konjungtivitis, batuk, diare, infeksi mata dan telinga, komedo, kongesti dada, demam, edema, sakit kepala, tekanan darah tidak normal, hysteria, nyeri sendi, jerawat, psoriasis, penyakit pernapasan, *scurvy*, kekurangan semen, sakit tenggorokan, tuberculosis, cacing usus, dan diabetes (Paliwal *et al.*, 2011).



Kelor digunakan untuk aborsi, diabetes, sebagai antipiretik, antiemetic, dan anti-*herpes simplex virus type 1* (HSV-1). Akarnya digunakan untuk laksatif, ekspektoran, diuretik, inflamasi, sakit tenggorokan, bronchitis, stomatitis, gangguan urinari, dan asma. Akar batangnya dapat digunakan untuk mengobati penyakit jantung, penyakit mata, inflamasi, dyspepsia, dan pembesaran limpa. Daunnya dapat digunakan untuk antiemetik, afrodisiak, mengatasi halusinasi, singultus, dan asma. Bunganya dapat digunakan untuk mengatasi inflamasi. Buahnya digunakan untuk mengobati nyeri, leukoderma, tumor, dan penyakit empedu. Bijinya dapat digunakan untuk mengobati penyakit mata. Dan minyaknya dapat digunakan untuk mengatasi kusta dan aplikasi topikal untuk mengobati reumatik (Goyal *et al.*, 2007).

Kelor umum digunakan sebagai pengobatan antikanker Ayurveda. Pengobatan menggunakan ekstrak daun kelor menunjukkan proteksi radiasi yang signifikan pada kromosom sumsum tulang mencit dan dapat mengatasi efek samping akibat terapi radiasi (Balachandran dan Rajgopal, 2005). Ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) mampu menurunkan ekspresi *nuclear factor-kappaB* (NF-kb) dan meningkatkan efek sitotoksik kemoterapi sel kanker pankreas (Panc-1, COLO-357, dan p34) (Berkovich *et al.*, 2013). Selain itu, ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) juga memiliki aktivitas antikanker, efek sitotoksik, terhadap HeLa *cell line* (Nair dan Varalakshmi, 2011) dan meningkatkan efek sitotoksik doxorubicin pada HeLa *cell line* (Hermawan *et al.*, 2012). Ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) juga memiliki aktivitas antikanker terhadap sel kanker pada epitel alveolar manusia (A549) dengan meningkatkan stress oksidatif dan fragmentasi DNA sehingga dapat memicu antiapoptosis. Dengan demikian, ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) memiliki efek antiproliferatif terhadap sel A549 (Tiloke *et al.*, 2013). Ekstrak daun

kelor (*M. oleifera*) juga mampu menurunkan ekspresi Hsp25 pada karsinogenesis kolon tikus wistar yang diinduksi DMBA (Rahmawati, 2013).

Ekstrak air, methanol (80%), dan etanol (70%) daun kering menunjukkan adanya aktivitas penangkal radikal dan antioksidan. Semua ekstrak tersebut mampu menangkal radikal peroksil dan superoksil. Komponen bioaktif utama fenol adalah golongan flavonoid, yaitu quercetin dan kaempferol (Goyal *et al.*, 2007).

### 2.5.6 Kandungan Kimia

Analisa Bioassay ekstrak etanol daun kelor menunjukkan adanya dua *nitrile glycosides*, *niazirin*, dan tiga *mustard oil glycosides*, 4-[4'-O-acetyl- $\alpha$ -L-rhamnosyloxy) benzyl] *isothiocyanate*, *niaziminin A* dan *B*. Terdapat pula  $\alpha$ -L-rhamnosida 4-hydroxy-benzyl dengan nitrile, carbamate, dan thiocarbamate. Selain itu, daun kelor mengandung 4-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyloxy)-benzylglucosinolate dan tiga isomer monoasetil dari glukosinolat tersebut, quercetin-3-O-glucoside dan quercetin-3-O-(6''-malonyl-glucoside), kaempferol-3-O-glucoside dan kaempferol-3-O-(6''-malonyl-glucoside) dalam jumlah sedikit, serta 3-caffeoylquinic dan 5-caffeoylquinic acid (Goyal *et al.*, 2007).

Quercetin yang terkandung dalam ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) terbukti mampu menurunkan ekspresi Hsp25 pada tikus wistar, homolog Hsp27 pada manusia, pada karsinogenesis kolon tikus wistar yang diinduksi DMBA (Rahmawati, 2013).

### 2.6 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan pemisahan bagian aktif jaringan tanaman atau hewan yang berkhasiat obat dari komponen yang tidak aktif atau *inert*



menggunakan pelarut tertentu sesuai dengan prosedur ekstraksi. Hasil ekstraksi dari tanaman adalah cairan, semisolid, atau serbuk murni yang hanya ditujukan untuk penggunaan secara oral atau penggunaan luar. Standardisasi prosedur ekstraksi untuk simplisia diperlukan untuk mendapatkan bagian yang memiliki efek terapi yang diinginkan dan untuk menghilangkan komponen *inert* menggunakan pelarut khusus yang disebut *menstruum*. Beberapa metode ekstraksi yang umum digunakan sebagai berikut (Handa, 2008),

- 1) Maserasi, yaitu prosedur dimana seluruh atau sebagian serbuk simplisia ditempatkan dalam tempat tertutup bersama dengan pelarut, dan ditempatkan dalam suhu ruang selama minimal 3 hari dengan pengadukan atau penggetaran sampai bahan terlarut sempurna. Campuran tersebut selanjutnya disaring, padatan yang basah ditekan, kemudian campuran cairan dilakukan filtrasi atau dekantasi.
- 2) Infusi, dilakukan dengan melakukan maserasi terhadap simplisia dalam waktu tertentu dengan air dingin atau mendidih.
- 3) Digesti, merupakan bentuk ekstraksi maserasi yang menggunakan panas rendah selama proses ekstraksi. Digesti digunakan ketika bahan tidak tahan terhadap suhu yang sangat tinggi.
- 4) Dekokta, yaitu prosedur dimana simplisia dididihkan dalam volume air tertentu selama beberapa waktu, kemudian didinginkan dan disaring atau difiltrasi. Prosedur ini tepat digunakan untuk bahan yang larut air dan bahan yang stabil dalam pemanasan.
- 5) Perkolasi, biasanya digunakan untuk mengekstraksi bahan aktif untuk pembuatan tinktur atau ekstrak cair. Prosedur ini dilakukan menggunakan alat yang disebut percolator. Bahan padat dilembabkan menggunakan



pelarut dalam jumlah tertentu dan dibiarkan selama beberapa waktu (kira-kira 4 jam) dalam tempat tertutup. Selanjutnya, dilakukan pengaliran keluar pelarut dan dialiri dengan pelarut baru.

- 6) *Soxhlet*, dimana simplisia diletakkan dalam *thimble* (kertas saring yang kuat) dan diletakkan dalam *chamber of Soxhlet apparatus*. Pelarut dalam *flask* dipanaskan dan akan mengembun dalam kondensor. Tetesan embun tersebut menuju *thimble* yang berisi simplisia dan akan terjadi proses ekstraksi melalui kontak antara keduanya.
- 7) Ekstraksi air-alkohol dengan fermentasi, yaitu dilakukan dengan merendam simplisia dalam waktu tertentu. Dalam waktu tersebut akan terjadi fermentasi dan menghasilkan *alcohol in situ*, akibatnya terjadi fasilitasi ekstraksi bahan aktif yang terdapat dalam simplisia.
- 8) *Counter-current extraction*, yaitu bahan yang masih basah diserbukkan menggunakan *toothed disc disintegrator*. Bahan yang akan diekstraksi bergerak satu arah dengan ekstraktor silinder sehingga akan mempertemukan bahan dengan pelarut. Setelah beberapa waktu, ekstrak akan terbentuk.
- 9) Sonikasi, merupakan prosedur yang melibatkan penggunaan ultrasound dengan frekuensi antara 20 kHz sampai 2000 kHz, akibatnya, terjadi peningkatan permeabilitas dinding sel dan terbentuk kavitas.
- 10) *Supercritical fluid extraction*, merupakan metode preparasi alternative fengan tujuan utama menurunkan penggunaan pelarut organik dan peningkatan bahan.

### 2.7 MTT Assay

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay merupakan uji berdasarkan konversi MTT menjadi kristal formazan pada sel hidup, yaitu untuk menentukan aktivitas mitokondria (Van *et al.*, 2011). MTT assay merupakan uji viabilitas sel homogen yang pertama dikembangkan untuk format 96-well yang tepat untuk *high throughput screening* (HTS) (Riss *et al.*, 2013).

Sel yang masih hidup, dengan metabolisme aktif mengubah MTT menjadi produk *formazan* berwarna ungu pada absorbansi maksimal mendekati 570 nm. Ketika sel mati, sel akan kehilangan kemampuan untuk mengubah MTT menjadi *formazan*, dengan demikian pembentukan warna merupakan penanda viabilitas sel. Mekanisme seluler penurunan pembentukan MTT menjadi *formazan* diketahui melibatkan reaksi dengan NADH dan enzim mitokondria yang spesifik untuk mengukur aktivitas enzim mitokondria (Riss *et al.*, 2013).

Pembentukan MTT menjadi *formazan* pada sel kultur bergantung pada waktu. Semakin lama waktu inkubasi maka akan terjadi akumulasi warna dan peningkatan sensitivitas. Namun, waktu inkubasi dibatasi karena reagen yang digunakan bersifat sitotoksik (Riss *et al.*, 2013).

### 2.8 Tunel Assay

*Tunel* (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP Nick End Labeling*) assay merupakan uji yang dilakukan berdasarkan pecahnya rantai DNA (DSBs) *in situ* dengan penandaan menggunakan *fluorochromes* untuk mengidentifikasi dan menghitung sel apoptosis menggunakan mikroskop fluoresensi atau sitometri (Darzynkiewicz *et al.*, 2008). *Tunel* assay

dikembangkan untuk mendeteksi sel apoptosis yang mengalami degradasi DNA saat tahap akhir apoptosis. Metode ini dilakukan berdasarkan kemampuan *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT) untuk menandai pecahnya ujung rantai ganda DNA (Kyrylkova *et al.*, 2012).

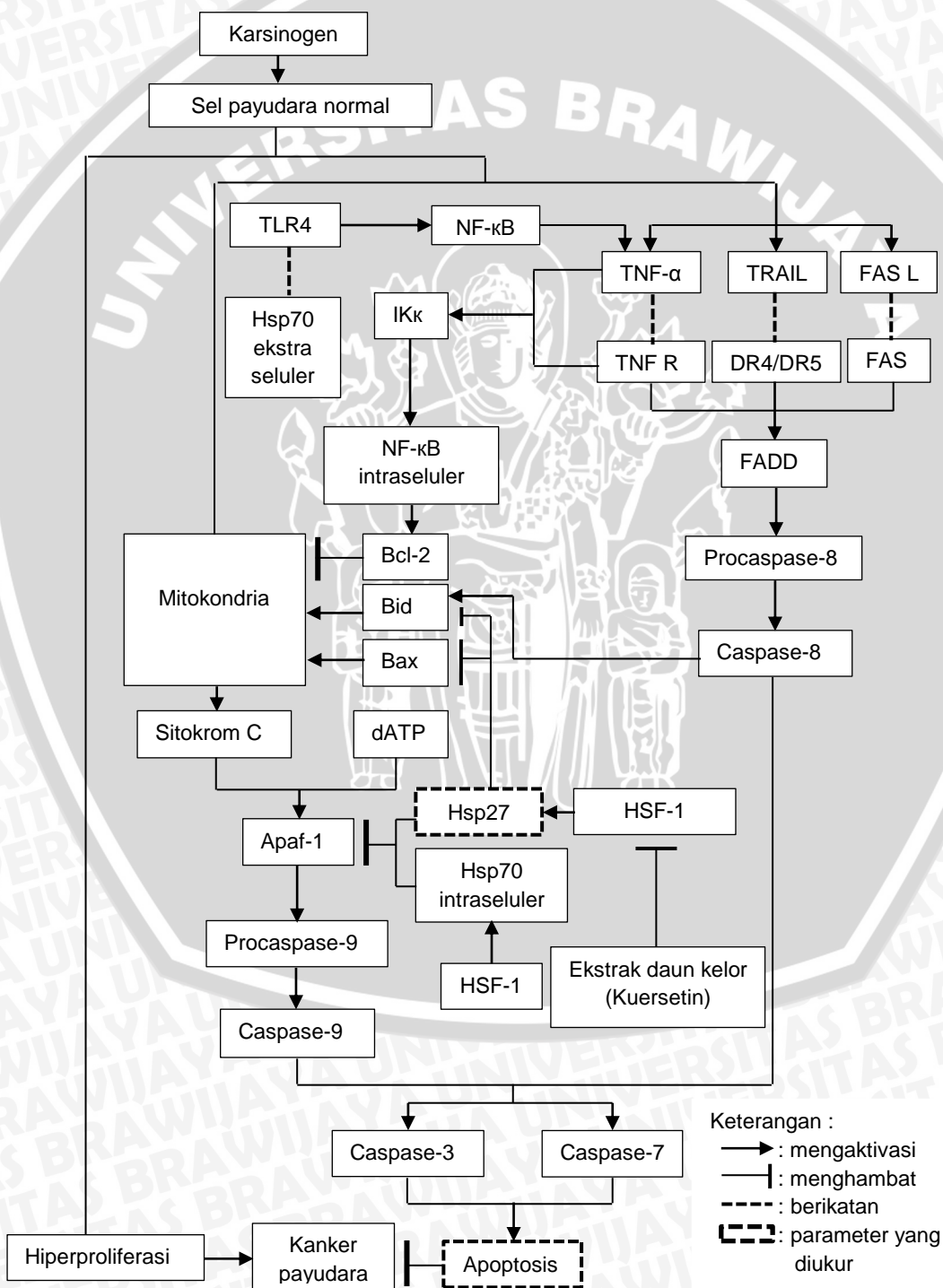




BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

Karsinogen dapat memicu kanker payudara melalui jalur proliferasi dan apoptosis sel. Karsinogen akan memicu hiperproliferasi sel secara tidak langsung sehingga menyebabkan kanker. Sedangkan, pada jalur apoptosis, terdapat dua jalur yaitu jalur ekstrinsik dan intrinsik, dimana kedua jalur tersebut berperan dalam proses apoptosis bergantung pada stimulasi di masing-masing jalur.

Pada jalur ekstrinsik, ligan kematian ( $TNF\alpha$ , TRAIL, FasL) akan berikatan dengan reseptor kematian masing-masing (TNF-R, DR4/DR5, dan FAS), akibatnya terbentuk kompleks, FADD, yang memicu aktivasi *caspase-8*. Pada gilirannya, *caspase-8* akan mengaktifkan *caspase-3* dan *caspase-7* sehingga terjadi apoptosis. Sedangkan, pada jalur intrinsik, dapat distimulasi oleh jalur ekstrinsik secara tidak langsung melalui aktivasi Bid oleh *caspase-8* sehingga memicu pelepasan sitokrom c dari mitokondria. Ikatan antara  $TNF\alpha$  dengan TNF-R sebagai ligan kematian dan reseptor kematian akan menghasilkan kompleks, IKK, yang akan memicu ekspresi NF $\kappa$ B. Aktivasi tersebut menyebabkan stimulasi Bcl-2, akibatnya, tidak terjadi pelepasan sitokrom c dan apoptosis terhambat. Translokasi Bid dan Bax menuju mitokondria akan memicu pelepasan sitokrom c, sedangkan translokasi Bcl-2 menuju mitokondria akan menghambat pelepasan sitokrom c. Sitokrom c yang dilepaskan oleh mitokondria, dengan adanya dATP, akan membentuk kompleks yang mengandung Apaf-1. Selanjutnya, Apaf-1 akan memicu aktivasi *caspase-9*, yang pada gilirannya akan memicu aktivasi *caspase-3* dan *caspase-7* sehingga terjadi apoptosis.

$TNF\alpha$  sebagai ligan kematian juga dapat distimulasi oleh TLR4 sehingga membentuk kompleks yang akan memutuskan terbentuknya FADD yang akan memicu proses apoptosis melalui aktivasi *caspase-8* atau terbentuknya IKK yang

akan memicu ekspresi NF $\kappa$ B yang akan menstimulasi Bcl-2 sehingga terjadi hambatan pelepasan sitokrom c dari mitokondria. TLR4 diinduksi oleh Hsp70 yang lepas menuju ekstraseluler karena terjadinya pelepasan ikatannya dengan HSF-1. Akibatnya, TLR4 akan menstimulasi NF $\kappa$ B yang akan menstimulasi TNF $\alpha$ , dimana pada gilirannya memicu atau menghambat apoptosis secara tidak langsung bergantung pada kompleks yang terbentuk.

Pada kanker payudara, terjadi mutasi pada faktor transkripsi, HSF-1 sehingga ekspresinya berlebihan. Ekspresi HSF-1 yang berlebihan akan memicu ekspresi Hsp70 dan Hsp27 secara berlebihan pula.

Hsp70 yang berlebihan dapat menghambat apoptosis melalui interaksinya dengan Apaf-1 sehingga secara tidak langsung akan menghambat aktivasi *caspase-9*, *caspase-3*, dan *caspase-7*, akibatnya tidak terjadi apoptosis. Hsp27 yang berlebihan juga dapat menghambat terjadinya apoptosis melalui beberapa mekanisme. Pada level mitokondria, Hsp27 mencegah permeabilisasi membran mitokondria melalui blokade translokasi Bax. Sedangkan, pada level post-mitokondria, Hsp27 berinteraksi dengan Apaf-1 sehingga secara tidak langsung dapat menghambat aktivasi *caspase-9*, *caspase-3*, dan *caspase-7*. Selain itu, Hsp27 dapat meregulasi aktivasi *caspase* yang diinduksi oleh sitokrom c pada tahap pre-mitokondria, Hsp27 menghambat rilis sitokrom c secara tidak langsung melalui aksinya terhadap Bid, dimana Bid teraktivasi akibat aktivasi *caspase-8*. Dengan demikian, melalui aksinya pada beberapa tahap, Hsp27 dapat memicu hambatan terhadap apoptosis.

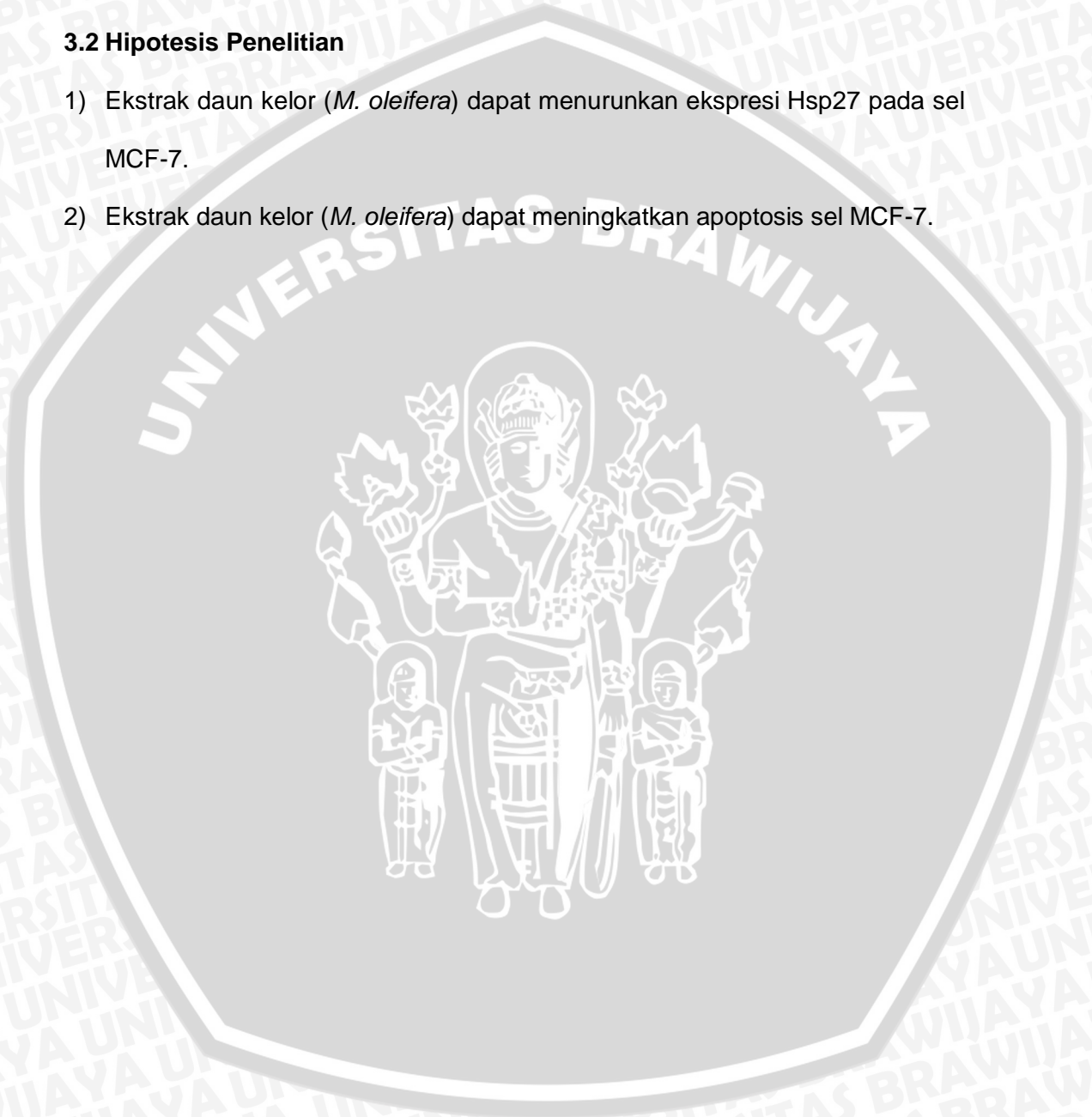
Sedangkan, ekstrak daun kelor (*M.oleifera*) yang mengandung quersetin dapat menghambat ekspresi HSF-1 yang berlebihan sehingga dapat menurunkan



level Hsp27. Penurunan level Hsp27 akan mempengaruhi proses apoptosis, yaitu meningkatkan terjadinya apoptosis sel kanker payudara.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

- 1) Ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dapat menurunkan ekspresi Hsp27 pada sel MCF-7.
- 2) Ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dapat meningkatkan apoptosis sel MCF-7.



## BAB 4

## METODE PENELITIAN

**4.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dengan studi empiris menggunakan desain *experimental in vitro post-test only, control group design* untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun kelor dalam menurunkan ekspresi Hsp27 dan menginduksi apoptosis sel MCF-7 dengan dosis yang efektif.

**4.2 Besar Sampel**

Sampel penelitian yang digunakan adalah sel MCF-7, yaitu *cell line* kanker payudara yang di kultur. Uji ekspresi Hsp27 dan uji apoptosis menggunakan dosis  $IC_{50}$ , yang didapatkan dari hasil MTT Assay,  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ , dan  $2 \times IC_{50}$ , serta kontrol (tanpa perlakuan ekstrak).

**4.2.1 Penentuan  $IC_{50}$  menggunakan MTT Assay**

Perhitungan pengulangan MTT (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

Tabel 4.1 Pembagian Kelompok Perlakuan MTT

No	Kelompok	Perlakuan Dosis
1	Kontrol negatif	Tanpa pemberian ekstrak daun kelor
2	Kontrol media	Berisi DMEM
3	I	20.000 µg/ml
4	II	10.000 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	VII	5800 µg/ml
11	IX	5600 µg/ml
12	X	5400 µg/ml
13	XI	5200 µg/ml
14	XII	4800 µg/ml
15	XII	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
31	XXX	1200 µg/ml

#### 4.2.2 Pengujian Ekspresi Hsp27 dan Apoptosis

Perhitungan pengulangan (Nazir, 2004) :

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

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

$$3 (n-1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 15 + 3$$



$n \geq 6$

Keterangan :

t : Jumlah Perlakuan

n : jumlah pengulangan

**Tabel 4.2 Pembagian Kelompok Perlakuan Pengujian Ekspresi Hsp27 dan Apoptosis**

No	Kelompok	Perlakuan Ekstrak ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	Kontrol tanpa antibodi	Tanpa pemberian antibodi primer
2	Kontrol negatif	Tanpa pemberian ekstrak daun kelor
3	I	$\frac{1}{2} \times \text{IC}_{50}$
4	II	$1 \times \text{IC}_{50}$
5	III	$2 \times \text{IC}_{50}$

#### 4.3 Variabel Penelitian

##### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dan waktu inkubasi 24 jam.

##### 4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah ekspresi Hsp27 dan apoptosis sel.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan bulan Februari – Juni 2014. Ekstraksi dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Brawijaya, Malang, Kultur sel MCF-7 dan MTT Assay di Laboratorium Pengujian dan Penelitian Terpadu, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, dan uji ekspresi Hsp27 dan apoptosis dilakukan di Laboratorium Biokomia, Universitas Brawijaya, Malang.

## 4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

### 4.5.1 Kultur Sel MCF-7

Sel MCF-7, medium DMEM, penicillin-streptomycin, mikropipet (*blue tip* dan *yellow tip*), tabung sentrifugal steril, FBS (Fetal Bovine Serum), PBS (*Phosphate Buffer Saline*), Sodium Bicarbonate, HCl, Tripsin-EDTA, aquadest, spirtus, alkohol 70%, *Laminar air-flow*, inkubator  $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$ , mikroskop *inverted*, 96-well *plates*, cover glass, *sentrifuge*, pipet disposable, pipet Tetes steril, hemasitometer, syringe, Filter 0.2  $\mu\text{m}$ , dan tisu.

### 4.5.2 Maserasi

Serbuk daun kelor (*M. oleifera*), etanol 70%, *stirrer*, kertas saring, *rotary evaporator*, timbangan digital, wadah maserasi (toples), wadah kaca (tempat hasil ekstrak), cawan porselen, corong dan aluminium foil.

### 4.5.3 Pemaparan pada Kultur Sel

Ekstrak daun kelor, sel MCF-7, *plate*, label, dan pipet tetes.

### 4.5.4 Uji Kualitatif Fitokimia

**Tannin** : 10 mg ekstrak, 15 ml akuades,  $\text{FeCl}_3$ . **Saponin** : 2 ml ekstrak, 3 ml akuades. **Flavonoid** : 1 ml ekstrak, 5% NaOH, 2M HCl. **Terpenoid** : 5 ml ekstrak, kloroform,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . **Alkaloid** : 125 mg ekstrak, 1,5% v/v HCl 5 ml, reagen Dragendorff. **Fenol** : 50 mg ekstrak, 5 ml akuades, reagen  $\text{FeCl}_3$  5%.

### 4.5.5 Penentuan $\text{IC}_{50}$ menggunakan MTT Assay

Plat 96-well dengan volume 100  $\mu\text{l/well}$ , inkubator, larutan MTT, *solubilization solution*, spektrofotometer.

#### 4.5.6 Pengujian Ekspresi Hsp27 menggunakan Metode Imunositokimia

Sel MCF-7, incubator CO<sub>2</sub>, Stok sampel (10 mg) dalam eppendorf, DMSO, DMEM, PBS, metanol, larutan hidrogen peroksida, novostain universal detection kit, antibodi monoklonal primer untuk Hsp27, xylol, dan mounting media. Mikropipet (20, 200, 1000 µL), tabung reaksi kecil, rak tabung kecil, vortex, *cover slip*, *object glass*, *24-well plate*, *6-well plate*, pinset, pipet Tetes, *laminair air-flow*, label, akuades, *blue tip*, *yellow tip*, buangan untuk media bekas, dan mikroskop cahaya.

#### 4.5.7 Pengujian Apoptosis menggunakan TUNEL Assay

Xylene, etanol 100%, etanol 95%, etanol 70%, air, aquadest steril, 50 µl TUNEL *labeling mix* (terdiri dari 5 µl enzim terminal deoxynucleotidyl transferase dan 45 µl fluorescein-dUTP), *siliconize cover slip*, incubator, PBS, *Rnase solution*, larutan propidium iodide, *cover slide*, mikroskop fluoresensi.

#### 4.6 Definisi Istilah/Operasional

- 1) Sel MCF-7 diperoleh dari Laboratorium Pengujian dan Penelitian Terpadu (LPPT) Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- 2) Serbuk daun kelor (*M. oleifera*) diperoleh dari Balai Materia Medika (BMM) Batu, Malang, Jawa Timur.
- 3) Ekstrak daun kelor diperoleh melalui ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.
- 4) IC<sub>50</sub> adalah dosis ekstrak daun kelor yang dapat menghambat proliferasi sel MCF-7 sebesar 50%. IC<sub>50</sub> ditentukan melalui pengujian MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) Assay.



- 5) Penghitungan indeks ekspresi Hsp27 dilakukan dengan menghitung sel yang mengekspresikan Hsp27 yang ditandai dengan warna coklat pada sitoplasma dan inti sel dibandingkan dengan jumlah total sel pada setiap lapang pandang sebagai indeks ekspresi Hsp27.
- 6) Apoptosis diuji menggunakan TUNEL Assay kemudian dihitung sel yang mengalami apoptosis (berwarna coklat). Selanjutnya, dibandingkan dengan dengan jumlah total sel pada setiap lapang pandang sebagai indeks apoptosis.

## 4.7 Prosedur Penelitian

### 4.7.1 Maserasi Daun Kelor

100 gram serbuk daun kelor (*M. oleifera*) dicampur dengan 1000 ml etanol selama 24 jam dengan pengadukan selama 30 menit pada suhu ruang. Ekstrak disaring menggunakan kertas saring. Dilakukan remaserasi sebanyak 2 kali. Selanjutnya, ekstrak dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Ekstrak ditimbang dan disimpan pada suhu -4°C.

### 4.7.2 Uji Kualitatif Fitokimia

**Tannin** : 10 mg ekstrak dilarutkan dalam 15 ml akuades, ditambahkan 3 FeCl<sub>3</sub>, sampel mengandung tanin jika berwarna coklat kehijauan sampai biru kehitaman. **Saponin** : 2 ml ekstrak ditambahkan 3 ml akuades, dikocok selama 15 menit, sampel mengandung saponin jika terbentuk buih stabil selama ± 10 detik. **Flavonoid** : 1 ml ekstrak ditambahkan 5% NaOH sebanyak 5 tetes, ditambahkan 2M HCl, sampel mengandung flavonoid jika berwarna kuning yang lebih pudar setelah ditambahkan 2M HCl. **Terpenoid** : 5 ml ekstrak ditambahkan kloroform sebanyak 1 ml, ditambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat sebanyak 2 ml, ditambahkan

1 ml kloroform dan 1 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sampel mengandung terpenoid jika berwarna coklat kemerahan di atas permukaan larutan. **Alkaloid** : 125 mg ekstrak dilarutkan dalam 1,5% v/v HCl 5 ml, disaring menggunakan kertas saring dan diambil sebanyak 2 ml, ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendorff, sampel berwarna oranye kecoklatan jika mengandung alkaloid. **Fenol** : 50 mg ekstrak dilarutkan dalam 5 ml akuades, ditambahkan 2-3 tetes reagen FeCl<sub>3</sub> 5%, sampel mengandung fenol jika berwarna hijau gelap.

#### 4.7.3 Kultur Sel MCF-7 (CCRC, 2013)

##### 4.7.3.1 Penumbuhan Sel

- 1) Disiapkan aliquot 3 mL DMEM dalam tabung sentrifugal steril.
- 2) Diambil ampul (*cryo tube*) yang berisi sel MCF-7 dari tangki nitrogen cair.
- 3) Dicairkan suspensi sel dalam ampul pada suhu kamar hingga tepat mencair.
- 4) Diambil suspensi sel menggunakan mikropipet 1 ml, dimasukkan tetes demi tetes ke dalam DMEM yang telah disiapkan dalam tabung sentrifugal.
- 5) Ditutup tabung sentrifugal dengan rapat. Disentrifugasi menggunakan *sentrifuge* untuk tabung sentrifugal (tanpa pendingin) pada 1000 rpm selama 5 menit sebanyak 2 kali.
- 6) Disemprot tabung sentrifugal dan tangan dengan alkohol 70 % dalam *laminair air-flow*.
- 7) Dibuka tabung sentrifugal, dituang supernatan DMEM ke dalam pembuangan.

- 8) Ditambahkan 4 ml DMEM baru, diresuspensikan kembali sel hingga homogen.
- 9) Ditransfer 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, serta dipastikan sel homogen pada seluruh permukaan *dish*.
- 11) Diberi penandaan dan disimpan sel ke dalam inkubator inkubator  $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$ .

#### 4.7.3.2 Pergantian Media

- 1) Dibuat aliquot PBS dan DMEM di dalam tabung sentrifugal.
- 2) Dibuang media lama secara perlahan menggunakan pipet tetes.
- 3) Dituang 3 ml PBS ke dalam *dish*, digoyang-goyangkan *dish* ke kanan dan ke kiri untuk mencuci sel.
- 4) Dibuang PBS menggunakan pipet tetes.
- 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 diamati keadaan sel setelah semalam.

#### 4.7.3.3 Pemanenan Sel

- 1) Diambil sel dari inkubator  $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$ , diamati kondisi sel, dipanen sel setelah sel 80% konfluen.
- 2) Dibuang media menggunakan pipet tetes steril.
- 3) Dicuci sel 2 kali dengan PBS 1x (volume PBS adalah  $\pm \frac{1}{2}$  volume media awal).



- 4) Ditambahkan tripsin-EDTA 1x (tripsin 0,25%) secara merata dan diinkubasi di dalam inkubator selama 3 menit.
- 5) Ditambahkan DMEM  $\pm$  5 mL untuk menginaktifkan tripsin, diresuspensikan sel dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu.
- 6) Diamati keadaan sel di mikroskop, diresuspensikan kembali jika masih ada sel yang menggerombol.
- 7) Ditransfer sel yang telah lepas satu-satu ke dalam tabung sentrifugal steril baru.

#### 4.7.3.4 Perhitungan Sel

- 1) Diambil sel dari inkubator  $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%$   $\text{CO}_2$ , diamati kondisi sel.
- 2) Dibuang media menggunakan pipet tetes steril.
- 3) Dicuci sel 2 kali dengan PBS 1x (volume PBS +  $\frac{1}{2}$  volume media awal).
- 4) Ditambahkan tripsin-EDTA 1x (tripsin 0,25%) secara merata dan diinkubasi di dalam inkubator selama 3 menit.
- 5) Ditambahkan media kurang lebih 2-3 ml untuk menginaktifkan tripsin, diresuspensikan sel dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu.
- 6) Diamati keadaan sel di mikroskop, diresuspensikan kembali jika masih ada sel yang menggerombol.
- 7) Ditransfer sel yang telah lepas satu-satu ke dalam tabung sentrifugal steril baru, tambahkan DMEM kurang lebih 2-3 ml, diresuspensikan sel.
- 8) Diambil 10  $\mu\text{l}$  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) Diresuspensikan suspensi sel di dalam tabung sentrifugal.
- 3) Diambil 300  $\mu$ l panen sel dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugal yang lain. Ditambahkan 7 ml DMEM dan diresuspensikan kembali.
- 4) Dituang sel ke dalam wadah (*dish*) yang telah disiapkan, dihomogenkan dan diamati kondisi dan jumlah sel secara kualitatif.
- 5) Diinkubasi semalam dan diganti DMEM setelah semalam, diamati keadaan sel sebelum dan setelah dilakukan pergantian media.

#### 4.7.4 Pemaparan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) pada Kultur Sel

- 1) Diencerkan ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dengan jumlah dan konsentrasi yang diinginkan di medium sel MCF-7.
- 2) Ditambahkan larutan ekstrak daun kelor ke dalam *plate*, didiamkan selama 24 jam.
- 3) Dicuci kembali larutan ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dengan medium sel.

#### 4.7.5 Penentuan IC<sub>50</sub> menggunakan MTT Assay

- 1) Serbuk MTT sebanyak 5 mg ditambahkan 1 ml PBS *qualified* ke dalam tabung falkon.
- 2) Ditambahkan DMEM sebanyak 9 ml.
- 3) Dibuang medium DMEM dalam *well-plate*.
- 4) Diambil 100  $\mu$ l larutan MTT dan ditambahkan pada masing-masing

well.

- 5) Diinkubasi selama 4-6 jam pada suhu 37°C dengan kadar 5% CO<sub>2</sub>.
- 6) Ditambahkan *stop solution* dan diinkubasi selama 24 jam.
- 7) Dibaca absorbansi pada panjang gelombang 550 nm menggunakan ELISA reader.
- 8) Dihitung % hambatan proliferasi sel menggunakan rumus (Putra *et al.*, 2011) :

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

#### 4.7.6 Pengujian Ekspresi Hsp27 menggunakan Metode Imunositokimia

Prosedur kerja imunositokimia Hsp27 sebagai berikut,

- 1) Diambil sel MCF-7 dari inkubator CO<sub>2</sub>, 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 5x10<sup>4</sup> sel/sumuran (5x10<sup>4</sup> sel/1000 µl DMEM)).
- 4) Dibuat pengenceran suspensi sel sehingga konsentrasi sel akhir 5x10<sup>4</sup> sel/1000 µl 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 µl 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  $\mu$ l. Untuk imunositokimia, minimal diperlukan 3 perlakuan : a. Perlakuan dengan ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) , b. Kontrol sel tanpa antibodi primer (akan menunjukkan warna biru), 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 $\mu$ 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  $\mu$ l ke dalam sumuran.
- 16) Dimasukkan 1000  $\mu$ l media kultur untuk kontrol sel.
- 17) Diinkubasi di dalam inkubator  $CO_2$  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  $\mu$ l 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) Diteteskan 2 tetes PBS pada masing-masing *cover slip*, didiamkan selama 5 menit, dibuang larutan PBS tersebut. Langkah ini dilakukan sebanyak 2 kali.
- 28) Diteteskan larutan hidrogen peroksida (*blocking solution*), diinkubasi selama 10 menit, dibuang larutan.
- 29) Diteteskan 2 tetes PBS pada masing-masing *cover slip*, didiamkan selama 5 menit, dibuang larutan PBS tersebut. Langkah ini dilakukan sebanyak 2 kali.
- 30) Diteteskan *prediluted blocking serum*, diinkubasi selama 10 menit, dibuang larutan.
- 31) Diteteskan 2 tetes PBS pada masing-masing *cover slip*, didiamkan selama 5 menit, dibuang larutan PBS tersebut. Langkah ini dilakukan sebanyak 2 kali.
- 32) Diteteskan 50  $\mu$ l antibodi monoklonal primer untuk antigen yang ingin diamati, yaitu untuk Hsp27, disimpan pada wadah yang sudah dilapisi tisu basah, didiamkan selama 2 jam, dibuang larutan antibodi monoklonan primer.
- 33) Diteteskan 2 tetes PBS pada masing-masing *cover slip*, didiamkan selama 5 menit, dibuang larutan PBS tersebut. Langkah ini dilakukan sebanyak 3 kali.

- 34) Diteteskan 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) Diteteskan 2 tetes PBS pada masing-masing *cover slip*, didiamkan selama 5 menit, dibuang larutan PBS tersebut. Langkah ini dilakukan sebanyak 3 kali.
- 36) Diteteskan reagen yang berisi kompleks streptavidin-enzim peroksidase, diinkubasi selama 40 menit, dibuang larutan kompleks streptavidin-enzim peroksidase.
- 37) Diteteskan 2 tetes PBS pada masing-masing *cover slip*, didiamkan selama 5 menit, dibuang larutan PBS tersebut. Langkah ini dilakukan sebanyak 2 kali.
- 38) Diteteskan 2 tetes aquades pada masing-masing *cover slip*, didiamkan selama 5 menit, dibuang aquades tersebut. Langkah ini dilakukan sebanyak 2 kali.
- 39) Diteteskan larutan substrat kromogen DAB, diinkubasi selama 15 menit, dibuang larutan substrat kromogen DAB.
- 40) Diteteskan 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) Diteteskan larutan MayeHaematoxylin, diinkubasi selama 3 menit.
- 43) Dialiri menggunakan aquades hingga bersih dari larutan MayeHaematoxylin.
- 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) Dilakukan penghitungan indeks ekspresi Hsp27 menggunakan rumus

$$\text{Indeks ekspresi Hsp27} = \frac{\sum \text{sel yang mengekspresikan Hsp27}}{\sum \text{total sel}} \times 100\%$$

#### 4.7.7 Pengujian Apoptosis menggunakan TUNEL Assay

- 1) Dicuci sel yang telah dilekatkan pada *slide glass* menggunakan PBS.
- 2) Ditambahkan *blocking solution* dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 15-25°C
- 3) Dicuci menggunakan PBS.
- 4) Ditambahkan *permeabilisation solution* dan diinkubasi selama 2 menit dalam ruang dengan suhu 2-8°C.
- 5) Dicuci menggunakan PBS sebanyak 2 kali.
- 6) Dikeringkan daerah sekitar sampel.
- 7) Ditambahkan TUNEL *reaction mixture* sebanyak 25 µl dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C yang lembab, gelap, dan di tempat yang tertutup.
- 8) Dicuci menggunakan PBS sebanyak 3 kali.
- 9) Ditambahkan *converter POD* sebanyak 50 µl dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.
- 10) Dicuci menggunakan PBS sebanyak 3 kali.

- 11) Ditambahkan DAB substrat sebanyak 50  $\mu$ l dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 15-25<sup>o</sup>C.
- 12) Dicuci menggunakan PBS sebanyak 3 kali.
- 13) Ditambahkan Mayer dan akuades, ditunggu hingga berwarna ungu kebiruan.
- 14) Dialiri akuades hingga bersih dari warna Mayer.
- 15) Dikeringkan *slide glass*.
- 16) Ditempel *coverslip* pada *slide glass*.
- 17) Dilakukan pengamatan sel menggunakan mikroskop cahaya.
- 18) Dilakukan penghitungan indeks apoptosis menggunakan rumus :

$$\text{Indeks apoptosis} = \frac{\Sigma \text{ sel yang mengalami apoptosis}}{\Sigma \text{ total sel}} \times 100\%$$

#### 4.8 Analisis Data

Data yang telah terkumpul diolah dan dilakukan analisis uji regresi untuk mengetahui pengaruh antara variabel bebas terhadap variabel terikat. Analisis uji regresi dilakukan melalui persyaratan analisis regresi yang disebut 'Asumsi Klasik', uji normalitas. Uji normalitas dilakukan menggunakan rumus dari Saphiro Wilk melalui program SPSS. Distribusi data dikatakan normal bila hasil signifikansi lebih besar dari 0,05 ( $p > 0,05$ ). Selanjutnya, dilakukan uji homogenitas. Data dikatakan homogen bila signifikansi lebih besar dari 0.05 ( $p > 0.05$ ). Selanjutnya, bila data terdistribusi normal dan data homogen, dilakukan uji korelasi Pearson untuk data hasil penentuan IC<sub>50</sub> menggunakan MTT Assay. Data dikatakan berhubungan kuat bila nilai R mendekati -1 atau +1 dan nilai  $p < 0.01$ . Sedangkan, untuk data pengujian ekspresi Hsp27 menggunakan imunositokimia dan data pengujian apoptosis menggunakan TUNEL Assay

selanjutnya dilakukan uji statistik parametrik ANOVA bila data terdistribusi normal dan data homogen. Uji ANOVA yang digunakan adalah *one way ANOVA*, yaitu analisis varians untuk satu variabel bebas. Analisis data dilakukan untuk mengetahui perbedaan rata-rata jumlah sel yang mengalami apoptosis dan mengalami penurunan ekspresi Hsp27 terhadap perlakuan yang diberikan.

Perbedaan signifikan bila  $p < 0,05$ . Hipotesis statistik apoptosis sel adalah :

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*).

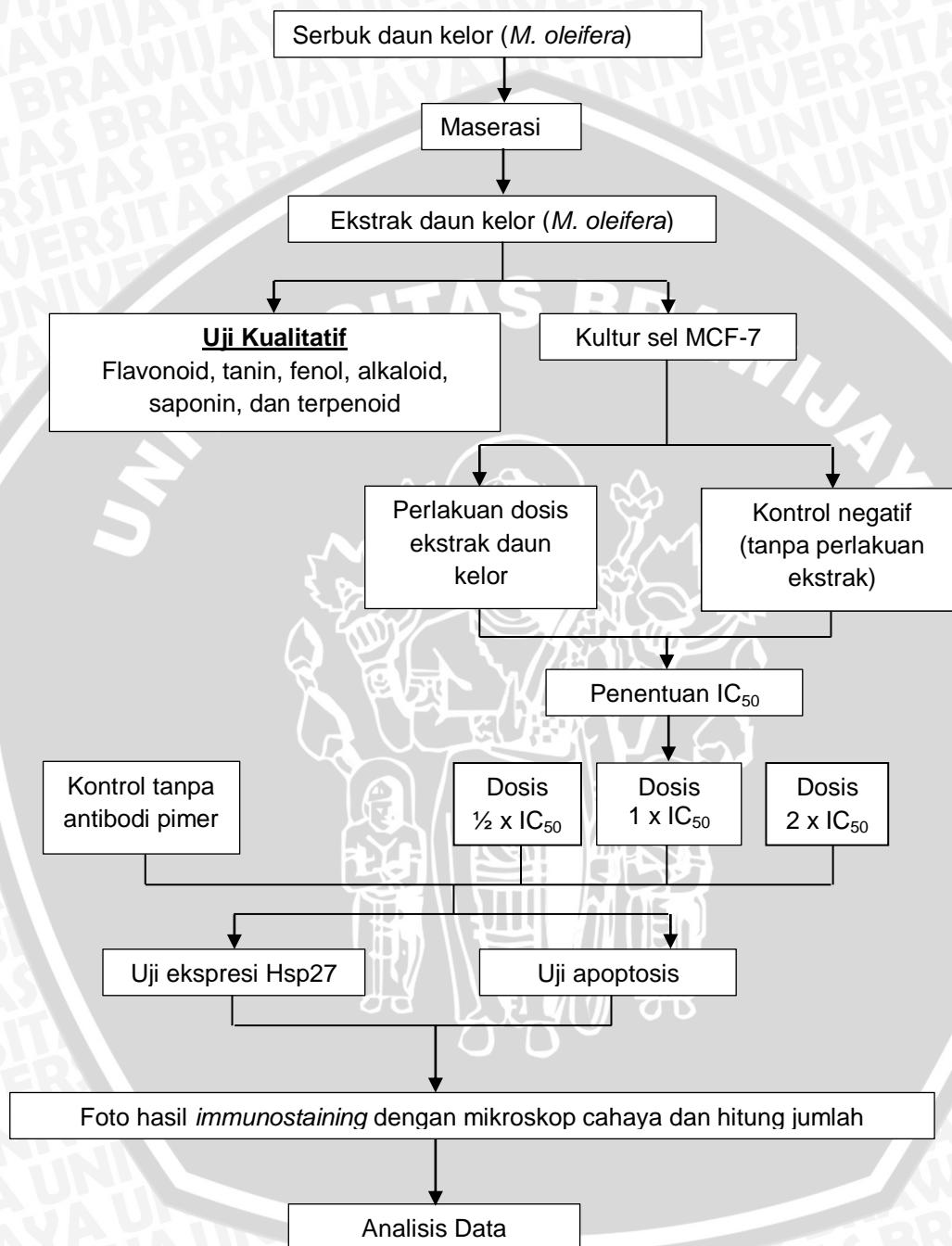
Sedangkan hipotesis statistik ekspresi Hsp27 adalah :

H0 : Tidak terjadi penurunan jumlah sel kanker payudara MCF-7 yang mengekspresikan Hsp27, menunjukkan bahwa tidak terjadi penurunan jumlah sel yang mengalami penurunan ekspresi Hsp27 setelah diberikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*).

H1 : Terjadi penurunan jumlah sel kanker payudara MCF-7 yang mengekspresikan Hsp27, menunjukkan bahwa terjadi penurunan jumlah sel yang mengalami penurunan ekspresi Hsp27 setelah diberikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*).



4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian



## BAB 5

## HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

## 5.1 Hasil Penelitian

## 5.1.1 Hasil Ekstraksi dan Uji Fitokimia

Hasil ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) yang didapatkan dalam penelitian adalah 37.81 gram dari total serbuk yang digunakan adalah 100 gram. Dari hasil pengamatan organoleptik, didapatkan ekstrak pekat yang berwarna hijau tua, konsistensi pekat, dan berbau khas kelor.

Uji fitokimia ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dilakukan secara kualitatif untuk mengetahui kandungan yang terdapat dalam ekstrak daun kelor (Tabel 5.1).

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

Zat yang Diuji	Hasil
Tanin	Positif
Saponin	Positif
Flavonoid	Positif
Terpenoid	Negatif
Alkaloid	Positif
Fenol	Positif

Ekstrak etanol daun kelor (*M. oleifera*) yang didapatkan dalam penelitian mengandung tannin, saponin, flavonoid, alkaloid, fenol, namun tidak

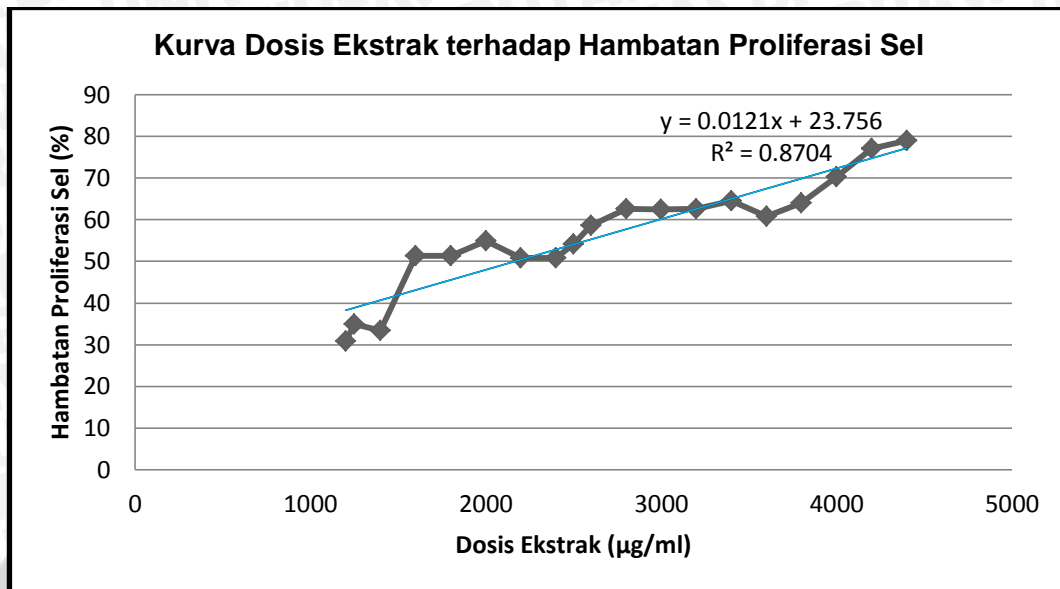
mengandung terpenoid yang ditandai dengan tidak terbentuknya warna coklat kemerahan pada permukaan larutan ekstrak yang telah diberikan kloroform dan  $H_2SO_4$  (Lampiran 4).

### 5.1.2 Hasil Penentuan $IC_{50}$ menggunakan MTT Assay

Tabel 5.2 Hasil Penentuan  $IC_{50}$  menggunakan MTT Assay

Dosis ( $\mu g/ml$ )	Rata-Rata Hambatan Proliferasi Sel (%)	Dosis ( $\mu g/ml$ )	Rata-Rata Hambatan Proliferasi Sel (%)
1200	30.9	3800	63.97
1250	34.93	4000	70.3
1400	33.4	4200	77.07
1600	51.34	4400	79.04
1800	51.34	4600	81.19
2000	54.9	4800	81.78
2200	50.86	5000	75.08
2400	50.86	5200	80.41
2500	54.17	5400	80.8
2600	58.58	5600	78.74
2800	62.62	5800	76.36
3000	62.5	6000	77.49
3200	62.62	6200	77.99
3400	64.5	10000	79.67
3600	60.78	20000	76.13





**Gambar 5.1 Kurva Dosis Ekstrak terhadap Hambatan Proliferasi Sel**

Pada penentuan dosis  $IC_{50}$  menggunakan dosis pada Tabel 5.2, didapatkan data dosis yang mendekati dosis  $IC_{50}$  yaitu 50,86% pada dosis 2200 µg/ml, namun belum diketahui secara pasti dosis  $IC_{50}$ . Selanjutnya, dilakukan pembuatan kurva regresi linier dosis ekstrak terhadap rata-rata hambatan proliferasi sel untuk mengetahui dosis  $IC_{50}$ . Kurva regresi linier yang telah dibuat menghasilkan persamaan regresi linier  $y = 0.0121x + 23.756$  dengan koefisien  $R^2 = 0.8704$  (Gambar 5.1). Dari persamaan tersebut, maka didapatkan dosis dimana terjadi hambatan proliferasi sel sebesar 50% yaitu 2168,93 µg/ml, selanjutnya dibulatkan menjadi 2200 µg/ml untuk memudahkan pemberian perlakuan pada sel.

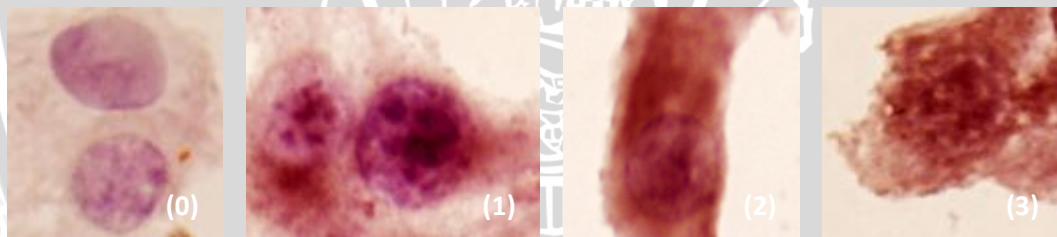
### 5.1.3 Hasil Pengujian Ekspresi Hsp27 menggunakan Metode

#### Imunositokimia

Penelitian menggunakan 4 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol (tidak dipaparkan ekstrak daun kelor (*M. oleifera*)), dosis  $\frac{1}{2} IC_{50}$  (1100 µg/ml),

dosis  $IC_{50}$  (2200  $\mu\text{g/ml}$ ), dan dosis  $2x IC_{50}$  (4400  $\mu\text{g/ml}$ ), dengan replikasi sebanyak 6 kali. Imunositokimia dilakukan setelah sel dipaparkan ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) selama 24 jam. Selanjutnya, diamati menggunakan mikroskop dan dilakukan perhitungan sel. Penampakan mikroskopik sel MCF-7 yang telah diberi perlakuan ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dapat dilihat pada Gambar 5.3. Perhitungan sel dilakukan dengan menghitung jumlah sel MCF-7 yang mengekspresikan Hsp27 yang ditandai dengan warna kecoklatan pada sitoplasma dan inti sel di setiap lapang pandang.

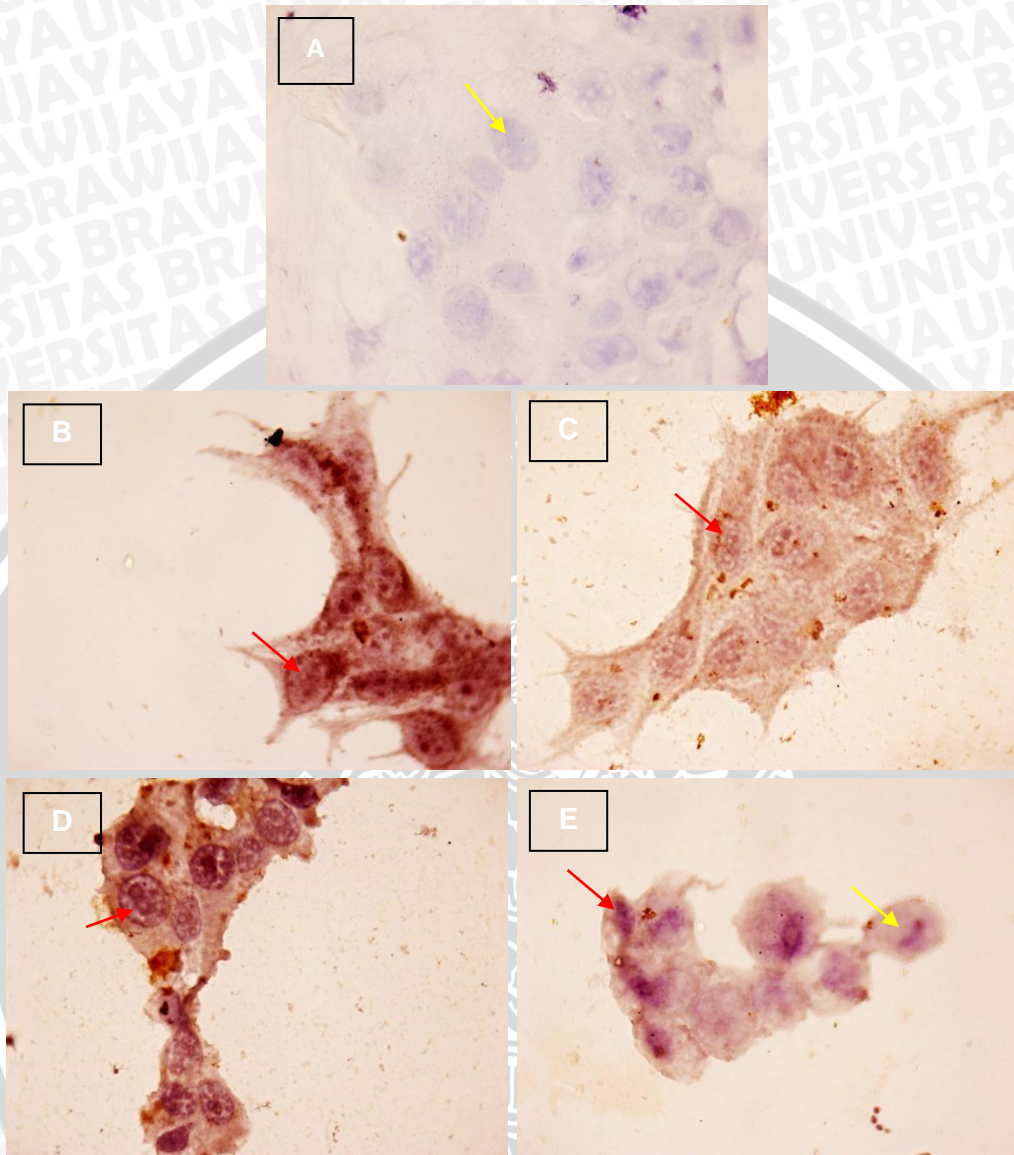
Sistem perhitungan dalam imunositokimia dilakukan berdasarkan derajat perhitungan yang ditetapkan oleh peneliti pada Gambar 5.2. Sel dengan intensitas dan distribusi sesuai gambar (1), (2), dan (3) akan diinterpretasikan sebagai sel yang mengekspresikan Hsp27 terdapat pada sitoplasma dan di dalam inti sel.



**Gambar 5.2 Penampakan Mikroskopik Sel MCF-7 pada perbesaran 1000x.**

Gambar (0) nukleus tampak jelas berwarna ungu (1) nukleus tampak jelas berwarna ungu dan terdapat warna coklat pada sitoplasma (2) nukleus tampak berwarna ungu yang pudar dan terdapat warna coklat pada sitoplasma dan telah menyebar hingga nukleus (3) nukleus sudah tidak tampak berwarna ungu dan terdapat warna coklat yang lebih kuat pada sitoplasma dan nukleus.





**Gambar 5.3 Penampakan Mikroskopik Hasil Uji Hsp27 Sel MCF-7 dengan Metode Imunositokimia.** (A) Kontrol tanpa antibodi primer, (B) Kontrol sel (tanpa perlakuan ekstrak), (C) Dosis 1100 µg/ml, (D) Dosis 2200 µg/ml, (E) Dosis 4400 µg/ml. Foto diambil menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x. Keterangan : tanda panah merah menunjukkan sel yang mengekspresikan Hsp27 yang ditandai dengan warna coklat pada sitoplasma dan inti sel, sedangkan tanda panah kuning menunjukkan sel yang tidak mengekspresikan Hsp27 yang ditandai warna ungu pada inti sel dan sitoplasma tidak berwarna coklat.

Indeks ekspresi Hsp27 merupakan persentase perbandingan jumlah sel yang mengekspresikan Hsp27 dan jumlah total sel pada setiap lapang pandang

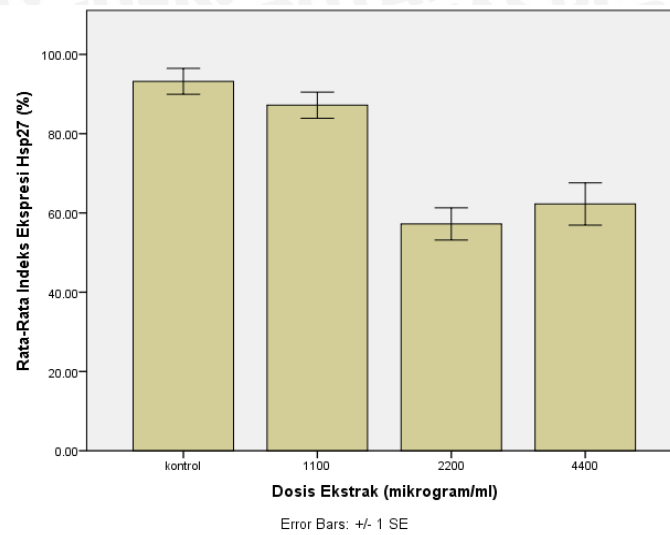


(Lampiran 5). Indeks ekspresi Hsp27 selanjutnya dilakukan perhitungan rata-rata pada setiap kelompok lapang pandang (Tabel 5.3).

**Tabel 5.3 Rata-Rata Indeks Ekspresi Hsp27**

Perlakuan	Indeks Ekspresi Hsp27						Rata-Rata $\pm$
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Replikasi 4	Replikasi 5	Replikasi 6	<i>Standard Error</i>
<b>Kontrol</b>	100	98.94	93.48	82.18	100	84.59	93.20 $\pm$ 3.27
<b>1100 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	72.5	88.89	86.32	97.1	90.34	87.98	87.19 $\pm$ 3.31
<b>2200 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	70.2	65.45	56.23	41.44	54.79	55.21	57.22 $\pm$ 4.07
<b>4400 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	75.2	75.68	49.15	50.75	51.37	71.43	62.26 $\pm$ 5.34

Berdasarkan Tabel 5.3, rata-rata indeks ekspresi Hsp27 masing-masing kelompok adalah kelompok kontrol sebesar 93.2  $\pm$  3.27, kelompok dosis 1100  $\mu\text{g/ml}$  sebesar 87.19  $\pm$  3.31, kelompok dosis 2200  $\mu\text{g/ml}$  sebesar 57.22  $\pm$  4.07, dan kelompok dosis 4400  $\mu\text{g/ml}$  sebesar 62.26  $\pm$  5.34. Selanjutnya, rata-rata indeks ekspresi Hsp27 ditampilkan pada grafik hubungan antara perlakuan terhadap nilai rata-rata indeks ekspresi Hsp27 yang dilengkapi dengan nilai  $\pm$  1 *standard error*.

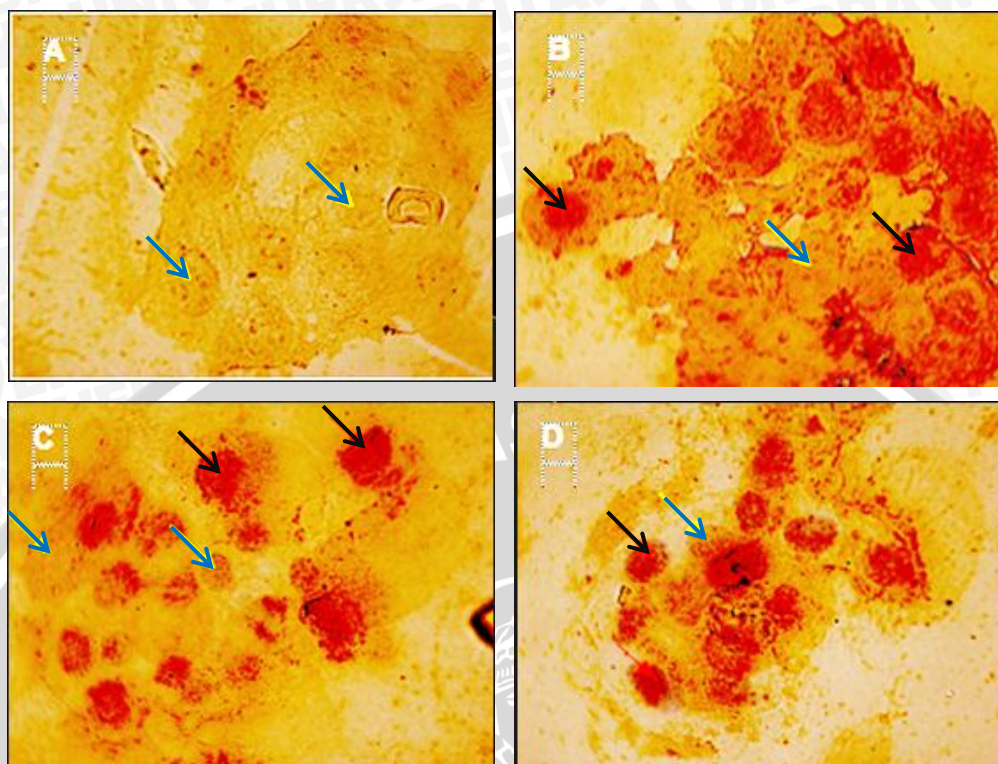


**Gambar 5.4 Grafik Dosis Ekstrak terhadap Rata-Rata Indeks Ekspresi Hsp27**

#### 5.1.4 Hasil Pengujian Apoptosis menggunakan TUNEL Assay

Penelitian menggunakan kelompok perlakuan yang sama dengan imunositokimia, yaitu kelompok kontrol (tidak dipaparkan ekstrak daun kelor (*M. oleifera*)), dosis  $\frac{1}{2}$   $IC_{50}$  (1100  $\mu\text{g/ml}$ ), dosis  $IC_{50}$  (2200  $\mu\text{g/ml}$ ), dan dosis  $2x$   $IC_{50}$  (4400  $\mu\text{g/ml}$ ), dengan replikasi sebanyak 6 kali. Pengujian ini dilakukan setelah sel dipaparkan ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) selama 24 jam. Selanjutnya, diamati menggunakan mikroskop dan dilakukan perhitungan sel. Perhitungan sel dilakukan dengan menghitung jumlah sel yang mengalami apoptosis yang ditandai dengan warna coklat gelap pada inti sel (**Gambar 5.5**).





**Gambar 5.5 Penampakan Mikroskopik Hasil Uji Apoptosis Sel mcf-7 dengan Metode TUNEL Assay.** (A) Kontrol sel (tanpa perlakuan ekstrak), (B) Dosis 1100 µg/ml, (C) Dosis 2200 µg/ml, (D) Dosis 4400 µg/ml. Foto diambil menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x. Keterangan : tanda panah hitam menunjukkan sel yang mengalami apoptosis yang ditandai dengan warna coklat gelap pada inti sel, sedangkan tanda panah biru menunjukkan sel yang tidak mengalami apoptosis yang ditandai warna coklat terang pada inti sel.

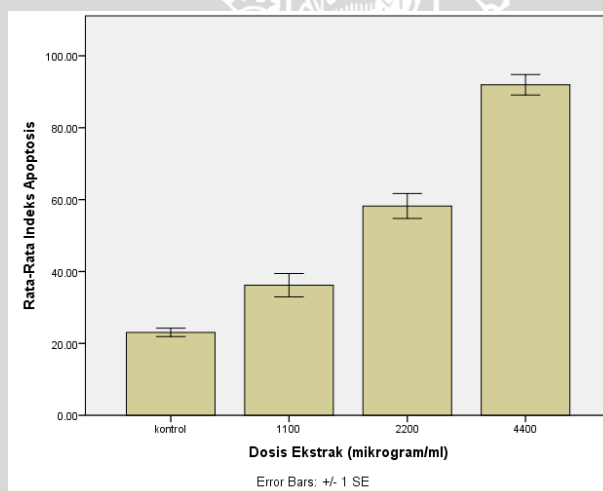
**Tabel 5.4 Rata-Rata Indeks Apoptosis**

Perlakuan	Indeks Apoptosis						Rata-Rata ±
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Replikasi 4	Replikasi 5	Replikasi 6	Standard Error
<b>Kontrol</b>	21.74	26.67	25	25	20	20	23.07 ± 1.17
<b>1100 µg/ml</b>	27.78	33.33	38.89	45.45	44.44	27.27	36.19 ± 3.26
<b>2200 µg/ml</b>	64	54.17	45.45	68	53.66	64	58.21 ± 3.48
<b>4400 µg/ml</b>	79.17	91.67	92.31	100	92.86	95.65	91.94 ± 2.85



Indeks apoptosis didapatkan dari persentase perbandingan jumlah sel yang mengalami apoptosis dan jumlah total sel pada setiap lapang pandang (**Lampiran 6**). Indeks apoptosis selanjutnya dilakukan perhitungan rata-rata pada setiap kelompok lapang pandang (**Tabel 5.4**).

Berdasarkan Tabel 5.4, rata-rata indeks apoptosis masing-masing kelompok adalah kelompok kontrol sebesar  $23.07 \pm 1.17$ , kelompok dosis 1100  $\mu\text{g/ml}$  sebesar  $36.19 \pm 3.26$ , kelompok dosis 2200  $\mu\text{g/ml}$  sebesar  $58.21 \pm 3.48$ , dan kelompok dosis 4400  $\mu\text{g/ml}$  sebesar  $91.94 \pm 2.85$ . Selanjutnya, rata-rata indeks apoptosis ditampilkan pada grafik hubungan antara perlakuan terhadap nilai rata-rata indeks apoptosis yang dilengkapi dengan nilai  $\pm 1$  *standard error*.



**Gambar 5.6 Grafik Dosis Ekstrak terhadap Rata-Rata Indeks Apoptosis**

## 5.2 Analisis Data

### 5.2.1 Hasil Penentuan $IC_{50}$ menggunakan MTT Assay

#### 5.2.1.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Data dilakukan uji normalitas menggunakan uji Saphiro-Wilk. Hasil uji menunjukkan bahwa data tidak terdistribusi normal dengan nilai  $p = 0.000$  ( $p < 0.05$ ). Selanjutnya, dilakukan uji homogenitas dan dihasilkan nilai  $p = 0.000$  ( $p < 0.05$ ) menunjukkan bahwa data tidak homogen. Selanjutnya, dilakukan

transformasi data, namun data tetap tidak terdistribusi normal dan tidak homogen (**Lampiran 7**). Oleh karena itu, peneliti menggunakan uji korelasi Spearman.

### 5.2.1.2 Uji Spearman

Uji Spearman merupakan uji korelasi yang dilakukan untuk mengetahui hubungan antara pemberian ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dalam berbagai dosis dengan persen kematian sel MCF-7 (**Lampiran 7**). Hasil uji Spearman ditunjukkan dengan nilai  $p = +0.950$ . Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan kuat dan positif antara pemberian ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dalam berbagai dosis dengan persen kematian sel MCF-7 karena mendekati angka  $+1$ , dimana semakin tinggi dosis maka semakin tinggi pula persen kematian sel. Sedangkan, angka sig.(2-tailed) menunjukkan angka  $0.000$  ( $p < 0.01$ ), dimana berarti bahwa terdapat hubungan yang sangat signifikan antara pemberian ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dalam berbagai dosis dengan persen kematian sel MCF-7.

## 5.2.2 Hasil Pengujian Ekspresi Hsp27 menggunakan Metode Imunositokimia

### 5.2.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Data hasil pengujian dilakukan uji normalitas menggunakan uji Saphiro-Wilk (**Lampiran 8**). Hasil uji menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dengan nilai  $p = 0.121$  ( $p > 0.05$ ) (**Lampiran 8**). Selanjutnya, dilakukan uji homogenitas dan dihasilkan nilai  $p = 0.110$  ( $p > 0.05$ ) menunjukkan bahwa data homogen.

### 5.2.2.2 Uji One Way ANOVA

Uji ANOVA dilakukan setelah data terbukti normal dan homogen. Hasil uji ANOVA adalah  $p = 0.000$  ( $p < 0.05$ ) (**Lampiran 8**). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan indeks ekspresi Hsp27 yang signifikan antara kelompok perlakuan kontrol dan kelompok perlakuan dosis ekstrak daun kelor.

### 5.2.2.3 Uji Post Hoc

**Tabel 5.5 Hasil Uji Post Hoc Indeks Ekspresi Hsp27**

Perbandingan antar Perlakuan	Nilai signifikansi	Interpretasi	
<b>Kontrol</b>	1100 µg/ml	0.728	Tidak signifikan
	2200 µg/ml	0.000	Signifikan
	4400 µg/ml	0.000	Signifikan
<b>1100 µg/ml</b>	Kontrol	0.728	Tidak signifikan
	2200 µg/ml	0.000	Signifikan
	4400 µg/ml	0.002	Signifikan
<b>2200 µg/ml</b>	Kontrol	0.000	Signifikan
	1100 µg/ml	0.000	Signifikan
	4400 µg/ml	0.818	Tidak signifikan
<b>4400 µg/ml</b>	Kontrol	0.000	Signifikan
	1100 µg/ml	0.000	Signifikan
	2200 µg/ml	0.818	Tidak signifikan

Uji Post Hoc (Tukey HSD) dilakukan untuk mengetahui kelompok dosis manakah yang memiliki perbedaan yang signifikan. Hasil analisis menunjukkan



adanya perbedaan yang signifikan terdapat pada kelompok perlakuan kontrol terhadap dosis 2200 dan 4400  $\mu\text{g/ml}$ , dan antara kelompok perlakuan dosis 1100  $\mu\text{g/ml}$  terhadap dosis 2200 dan 4400  $\mu\text{g/ml}$ . Hal itu ditunjukkan dengan nilai  $p < 0.05$  (**Tabel 5.5**) (**Lampiran 8**). Sedangkan, antara kelompok perlakuan kontrol terhadap kelompok perlakuan dosis 1100  $\mu\text{g/ml}$  dan kelompok perlakuan dosis 2200  $\mu\text{g/ml}$  terhadap kelompok perlakuan dosis 4400  $\mu\text{g/ml}$  tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Hal itu ditunjukkan dengan nilai  $p > 0.05$  (**Tabel 5.5**) (**Lampiran 8**).

#### 5.2.2.4 Uji Pearson

Uji korelasi Pearson dilakukan untuk mengetahui hubungan antara pemberian ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) terhadap indeks ekspresi Hsp27 pada sel MCF-7. Hasil uji menunjukkan nilai  $r = -0.764$  sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang kuat dan negatif antara pemberian ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dengan ekspresi Hsp27 pada sel MCF-7. Sedangkan, nilai sig.(2-tailed) menunjukkan angka 0.000 ( $p < 0.01$ ), dimana berarti bahwa terdapat hubungan yang sangat signifikan antara pemberian ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dalam berbagai dosis dengan indeks ekspresi Hsp27 (**Lampiran 8**).

### 5.2.3 Hasil Pengujian Apoptosis menggunakan TUNEL Assay

#### 5.2.3.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Data hasil pengujian dilakukan uji normalitas menggunakan uji Saphiro-Wilk. Hasil uji menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dengan nilai  $p > 0.05$  (**Lampiran 9**). Selanjutnya, dilakukan uji homogenitas dan dihasilkan nilai  $p = 0.102$  ( $p > 0.05$ ) menunjukkan bahwa data homogen.

### 5.2.3.2 Uji One Way ANOVA

Uji One Way ANOVA dilakukan bila data telah terbukti normal dan homogen. Hasil uji adalah  $p = 0.000$  ( $p < 0.05$ ) (**Lampiran 9**). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan indeks apoptosis yang signifikan antara kelompok perlakuan kontrol dan kelompok perlakuan dosis ekstrak daun kelor.

### 5.2.3.3 Uji Post Hoc

**Tabel 5.6 Hasil Uji Post Hoc Indeks Apoptosis**

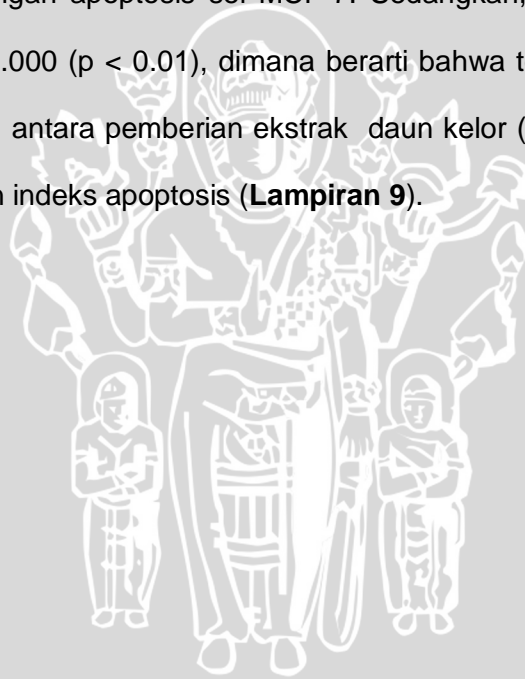
Perbandingan antar Perlakuan	Nilai signifikansi	Interpretasi	
<b>Kontrol</b>	1100 µg/ml	0.018	Signifikan
	2200 µg/ml	0.000	Signifikan
	4400 µg/ml	0.000	Signifikan
<b>1100 µg/ml</b>	Kontrol	0.018	Signifikan
	2200 µg/ml	0.000	Signifikan
	4400 µg/ml	0.000	Signifikan
<b>2200 µg/ml</b>	Kontrol	0.000	Signifikan
	1100 µg/ml	0.000	Signifikan
	4400 µg/ml	0.000	Signifikan
<b>4400 µg/ml</b>	Kontrol	0.000	Signifikan
	1100 µg/ml	0.000	Signifikan
	2200 µg/ml	0.000	Signifikan

Uji Post Hoc (Tukey HSD) dilakukan untuk mengetahui kelompok dosis manakah yang memiliki perbedaan yang signifikan. Hasil analisis menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan terdapat pada seluruh antar kelompok

perlakuan terhadap indeks apoptosis. Hal itu ditunjukkan dengan nilai masing-masing perbandingan antar perlakuan adalah  $p < 0.05$  (**Tabel 5.6**) (**Lampiran 9**).

#### 5.2.3.4 Uji Pearson

Uji korelasi Pearson dilakukan untuk mengetahui hubungan antara pemberian ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) terhadap indeks apoptosis pada sel MCF-7. Hasil uji menunjukkan nilai  $r = + 0.952$  sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang kuat dan positif antara pemberian ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dengan apoptosis sel MCF-7. Sedangkan, nilai sig.(2-tailed) menunjukkan angka 0.000 ( $p < 0.01$ ), dimana berarti bahwa terdapat hubungan yang sangat signifikan antara pemberian ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dalam berbagai dosis dengan indeks apoptosis (**Lampiran 9**).





## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Uji Fitokimia Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*)

Hasil uji fitokimia ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) menunjukkan hasil positif pada uji kandungan tanin, saponin, flavonoid, alkaloid, dan fenol, yang ditandai dengan perubahan warna yang muncul setelah diberikan *reagen*. Namun, pada uji kandungan terpenoid, hasil menunjukkan negatif, yaitu tidak perubahan warna coklat kemerahan pada permukaan larutan ekstrak setelah diberikan kloroform dan  $H_2SO_4$ . Hasil uji fitokimia tidak berbeda dengan hasil penelitian terdahulu (Roopalatha dan Nair, 2013) yang menunjukkan adanya kandungan tanin, saponin, flavonoid, alkaloid, dan fenol, namun berbeda pada hasil uji kandungan terpenoid. Perbedaan hasil uji kandungan dapat disebabkan karena perbedaan metode ekstraksi. Metode ekstraksi pada penelitian ini menggunakan metode maserasi, sedangkan pada penelitian oleh Roopalatha *et al.*, 2013, menggunakan metode soxhletasi. Hasil penelitian lain (Vinoth *et al.*, 2012) juga menunjukkan adanya kandungan terpenoid pada ekstrak etanol daun kelor. Perbedaan hasil uji tersebut berbeda dapat dikarenakan karena perbedaan metode ekstraksi, yaitu menggunakan ekstraksi panas.

#### 6.2 Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Hasil MTT Assay

MTT Assay didasarkan pada konversi MTT menjadi kristal formazan oleh sel yang masih hidup, dimana hal itu menentukan aktivitas mitokondria (van Merloo *et al.*, 2011). MTT diabsorpsi ke dalam sel dan menurun konsentrasinya akibat adanya reaksi mitokondrial untuk membentuk formazan. Formazan

berakumulasi dalam sel karena tidak dapat melewati membran sel. Setelah ditambahkan pelarut, DMSO, formazan akan terlarut dan dikeluarkan dari intraselular. Selanjutnya, formazan dapat dibaca secara kolorimetri. Hanya sel yang masih hidup yang mampu menurunkan MTT, jumlah penurunan konsentrasi MTT proporsional dengan pembentukan warna biru keunguan (Barile, 2013). Pada penelitian ini, MTT Assay dilakukan untuk menentukan dosis  $IC_{50}$ .

Penelitian oleh Shariar *et al.*, 2012, menunjukkan bahwa  $IC_{50}$  ekstrak etanol daun kelor (*M. oleifera*) sebagai penangkal radikal bebas adalah 62.09  $\mu\text{g/ml}$  dari dosis yang digunakan yaitu mulai dari 15.625  $\mu\text{g/ml}$  hingga 250  $\mu\text{g/ml}$ . Penelitian lain (Pamok *et al.*, 2012) mengenai efek antiproliferasi ekstrak etanol kelor (*M. oleifera*) pada kanker kolon tipe sel HCT15, SW48, dan SW480. Dosis  $IC_{50}$  yang didapatkan pada masing-masing tipe sel tersebut adalah  $264.83 \pm 23.33$ ,  $102.40 \pm 16.08$ , dan  $197.20 \pm 32.52$   $\mu\text{g/ml}$ . Selain itu, penelitian lain oleh Saetung *et al.*, 2005, mengenai aktivitas antikanker ekstrak etanol daun kelor (*M. oleifera*) pada kanker adenokarsinoma paru (CORL-23) dan kanker prostat (PC3). Penelitian tersebut menghasilkan dosis  $IC_{50}$  untuk masing-masing kanker adalah  $105.47 \pm 1.15$  dan  $98.09 \pm 3.49$   $\mu\text{g/ml}$ .

Penelitian mengenai ekstrak etanol daun kelor (*M. oleifera*) sebagai antikanker payudara MCF-7 belum ada. Oleh karena itu, berdasarkan beberapa penelitian terdahulu mengenai ekstrak etanol daun kelor (*M. oleifera*) pada beberapa jenis kanker yang telah disebutkan, peneliti menentukan dosis untuk dilakukan MTT Assay sehingga didapatkan dosis  $IC_{50}$  (**Tabel 5.2**). Berdasarkan kurva regresi linier yang telah dibuat (**Gambar 5.1**), maka didapatkan dosis  $IC_{50}$  terletak pada dosis 2200  $\mu\text{g/ml}$ . Selanjutnya, ditentukan dosis  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$  dan  $2 \times$



IC<sub>50</sub>, yaitu 1100 µg/ml dan 4400 µg/ml, dimana ketiga kelompok dosis tersebut digunakan untuk uji ekspresi Hsp27 dan apoptosis sel MCF-7.

### 6.3 Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Ekspresi Hsp27 dan Apoptosis Sel Kanker Payudara MCF-7

Pengujian ekspresi Hsp27 dilakukan menggunakan metode imunositokimia. Metode imunositokimia menggunakan antibodi untuk mendeteksi antigen selular pada sampel. Sebagian besar antibodi yang digunakan adalah antibodi monoklonal (Erber, 2010).

Hsp27 secara normal terinduksi pada kondisi stres untuk melindungi sel, namun mengalami ekspresi yang berlebihan pada kondisi kanker, termasuk kanker payudara (Wei *et al.*, 2011). Ekspresi Hsp27 yang berlebihan tersebut dapat disebabkan oleh terjadinya mutasi pada HSF-1 akibat kondisi stres (Kanagasabai *et al.*, 2011). Ekspresi Hsp27 yang berlebihan dapat menghambat apoptosis sel secara berlebihan pula sehingga sel kanker akan semakin tumbuh (Rérole *et al.*, 2010).

Hasil analisis statistik uji ANOVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan indeks ekspresi Hsp27 yang signifikan antara kelompok perlakuan kontrol dan kelompok perlakuan dosis ekstrak daun kelor ( $p = 0.121$ ) (**Lampiran 5**). Hasil uji korelasi menunjukkan adanya hubungan yang kuat dan negatif antara pemberian ekstrak daun kelor dalam beberapa kelompok dosis terhadap indeks ekspresi Hsp27. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi penurunan indeks ekspresi Hsp27 pada dosis 1100, 2200, dan 4400 µg/ml bila dibandingkan dengan kontrol meskipun perbedaan indeks ekspresi Hsp27 pada kelompok kontrol dengan kelompok dosis 1100 µg/ml tidak signifikan. Namun, pada dosis



4400 µg/ml, terjadi peningkatan indeks ekspresi Hsp27 dibandingkan dengan dosis 2200 µg/ml, namun perbedaan antara kedua kelompok tersebut tidak signifikan (**Tabel 5.6**). Penelitian terdahulu oleh Rahmawati, 2013, juga menunjukkan hal yang serupa, yaitu terjadi penurunan jumlah sel yang mengekspresikan Hsp25 (homolog Hsp27) pada dosis 20 mg/kg/hari dan 40 mg/kg/hari. Namun, terjadi peningkatan jumlah sel yang mengekspresikan Hsp25 pada dosis 80 mg/kg/hari. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak daun kelor mampu menurunkan ekspresi Hsp27 pada sel MCF-7 hingga titik tertentu, pada penelitian ini adalah dosis 2200 µg/ml, namun dapat meningkatkan ekspresi Hsp27 pada dosis yang lebih tinggi, pada penelitian ini adalah dosis 4400 µg/ml.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) mampu menurunkan ekspresi Hsp27 sel kanker payudara MCF-7 dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal tersebut berkaitan dengan kandungan yang terkandung dalam ekstrak daun kelor, terutama flavonoid, dimana kombinasi kemoterapi dengan herbal yang mengandung flavonoid dapat menghambat ekspresi Hsp27 sehingga dapat menekan pertumbuhan kanker (Wei *et al.*, 2011). Pada penelitian ini, sel kanker payudara MCF-7 hanya diberikan ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) yang mengandung flavonoid, tanpa kombinasi dengan kemoterapi. Hasil penelitian menunjukkan terjadinya penghambatan ekspresi Hsp27 yang ditunjukkan dengan penurunan indeks ekspresi Hsp27 pada sel yang diberikan ekstrak dibandingkan dengan kontrol sel. Penelitian terdahulu oleh Rusak *et al.*, 2002, juga menunjukkan bahwa flavonoid, kuersetin dan kaempferol, merupakan inhibitor yang poten terhadap ekspresi Hsp27. Hal tersebut ditunjukkan dengan efek penghambatan yang signifikan, yaitu 55%. Selain flavonoid, alkaloid juga berperan terhadap

penurunan ekspresi Hsp27. Hal itu ditunjukkan oleh Chen *et al.*, 2012, bahwa alkaloid dapat menurunkan regulasi Hsp27 sehingga akan mempengaruhi proses seluler, seperti proliferasi, sitokinesis, dan migrasi sel kanker.

Hsp27 muncul sebagai respon terhadap kondisi stres, dimana berfungsi melindungi sel dari apoptosis (Vidyasagar *et al.*, 2012). Pada kanker payudara, terjadi ekspresi Hsp27 yang berlebihan (Chen *et al.*, 2012). Hsp27 harus diturunkan ekspresinya dalam kaitannya sebagai protein yang dapat menghambat proses apoptosis sehingga proses apoptosis tidak terhambat dan pertumbuhan kanker dapat terhambat.

Hsp27 dapat menghambat apoptosis melalui regulasi disfungsi mitokondria, yaitu melalui penghambatan produksi ROS dan depolarisasi membran mitokondria. Pada jalur ekstrinsik, Hsp27 memblok apoptosis yang dimediasi oleh Daxx melalui pencegahan translokasi Daxx menuju membran plasma dan kaitannya dengan reseptor Fas. Hsp27 sebagai regulator negatif pelepasan molekul pro-apoptosis oleh mitokondria bekerja dengan mempertahankan homeostasis intraselular dan stabilitas mitokondria. Selain itu, Hsp27 dapat meregulasi aktivasi caspase dengan mencegah aktivasi caspase-9 melalui aksinya dalam menghambat pelepasan sitokrom c (Murnan, 2009).

Penelitian oleh Leelawat S dan Leelawat K *et al.*, 2014, mengenai aktivitas ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) sebagai penginduksi apoptosis sel *cholangiocarcinoma* menunjukkan bahwa terjadi peningkatan apoptosis sel seiring dengan peningkatan dosis ekstrak daun kelor (*M. oleifera*), yaitu 1, 10, dan 100 µg/ml, dibandingkan dengan perlakuan kontrol.

Kandungan fitokimia lain yang terdapat dalam ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*), seperti saponin, alkaloid, dan tannin, juga diketahui memiliki



efek terhadap apoptosis sel kanker. Penelitian oleh Wang *et al.*, 2013, menunjukkan bahwa saponin dapat menekan pertumbuhan kanker lambung secara efektif seperti agen kemoterapi, melalui apoptosis dan hambatan proliferasi sel. Saponin dapat mempengaruhi proliferasi, invasi, dan apoptosis sel kanker lambung BGC-823, namun mekanisme secara pasti belum diketahui. Selain itu, penelitian oleh Cheng *et al.*, 2011, menunjukkan bahwa saponin dapat menghambat pertumbuhan sel kanker prostat PC-3. Saponin tersebut dapat menginduksi penghentian siklus sel PC-3 pada fase S dan G2/M, dimana semakin meningkat dosis maka semakin meningkat jumlah sel yang mengalami apoptosis. Hasil uji Western blot menunjukkan bahwa saponin dapat memodulasi regulator G2 dan M *checkpoint*, *cyclin A* dan B, protein antiapoptosis, Bcl-2 dan Bcl-xl, dan protein pro-apoptosis, Bad dan Bax, Ekspresi *caspase-3* dan aktivitasnya dalam menurunkan DFF45 dan *poly (ADP-ribose) polymerase-1* (PARP-1) meningkat seiring dengan peningkatan dosis. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa apoptosis sel PC-3 terjadi melalui jalur intrinsik.

Efek alkaloid terhadap apoptosis telah dibuktikan oleh Li *et al.*, 2008. Hasil penelitian menunjukkan bahwa alkaloid dapat menghambat pertumbuhan sel HeLa. Alkaloid tersebut dapat menginduksi apoptosis sel HeLa melalui perubahan morfologi ultrastruktural yang diamati menggunakan mikroskop electron. Hasil penelitian menunjukkan peningkatan apoptosis seiring dengan peningkatan konsentrasi dan waktu. Peneliti menduga bahwa penghambatan pertumbuhan sel HeLa terjadi melalui penghambatan pembelahan sel dan meningkatkan aktivitas *caspase-3* untuk menginduksi apoptosis. Selain itu, penelitian oleh Adnyana *et al.*, 2012, menunjukkan bahwa alkaloid dapat menyebabkan apoptosis sel myeloma yang berkaitan dengan gen p53 dan



*cycline dependent kinase*. Hasil menunjukkan bahwa alkaloid dapat meningkatkan apoptosis sel kanker payudara melalui regulasi ekspresi p53 dan menghambat level CDK pada sel kanker payudara.

Sedangkan, efek tannin terhadap apoptosis sel kanker ditunjukkan oleh Seeram *et al.*, 2005, mengenai efek apoptosis sel kanker kolon HT-29 dan HCT116, bahwa tannin yang terkandung dalam Pomegranate dapat menginduksi apoptosis sel kanker kolon HT-29 dan HCT119. Selain itu, penelitian oleh Gany dan Mohammed, 2011, menunjukkan bahwa tannin yang terkandung dalam pomegranate juice dapat menghambat pertumbuhan sel dan menginduksi apoptosis sel kanker serviks.

Hasil analisis statistik ANOVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara indeks apoptosis dengan kelompok perlakuan kontrol dan perlakuan dosis dengan  $p = 0.000$ . Hasil analisis Pearson menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang kuat dan positif antara pemberian ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) terhadap indeks apoptosis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa seiring peningkatan dosis, maka indeks apoptosis semakin meningkat hingga dosis 4400  $\mu\text{g/ml}$  (**Gambar 5.6**).

Berkaitan dengan hasil penelitian mengenai uji ekspresi Hsp27 dan uji apoptosis sel dan peran Hsp27 sebagai penghambat apoptosis, maka ekstrak daun kelor dapat meningkatkan apoptosis sel MCF-7 pada dosis 1100, 2200, dan 4400  $\mu\text{g/ml}$  melalui hambatan ekspresi Hsp27 yang ditunjukkan dengan penurunan ekspresi Hsp27 pada dosis 2200 dan 4400  $\mu\text{g/ml}$ .

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan ini, terdapat keterbatasan penelitian, yaitu, tidak dilakukan uji kuantitatif kandungan fitokimia ekstrak daun kelor (*M. oleifera*), terutama flavonoid (kuersetin), Selain itu, tidak dilakukan

penelitian lebih lanjut mengenai uji ekstrak daun kelor pada sel kanker payudara bila dibandingkan dengan terapi konvensional. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan karena aktivitas antikanker ekstrak daun kelor memiliki potensi untuk dikembangkan.



## BAB 7

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

- 1) Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan ekspresi Hsp27 sel MCF-7.
- 2) Ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) dapat meningkatkan apoptosis sel MCF-7.
- 3) Nilai IC<sub>50</sub> ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) yang didapatkan dari MTT Assay adalah 2200 µg/ml.

#### 7.2 Saran

- 1) Perlu dilakukan penelitian uji kuantitatif kandungan fitokimia ekstrak daun kelor (*M. oleifera*), untuk memperoleh data konsentrasi kandungan fitokimia pada ekstrak daun kelor (*M. oleifera*), terutama flavonoid.
- 2) Perlu dilakukan penelitian uji ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) terhadap sel normal untuk mengetahui pengaruhnya pada sel normal, terutama toksisitas pada sel normal.
- 3) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) pada kanker payudara bila dibandingkan dengan terapi konvensional sehingga dapat diketahui aktivitasnya bila dibandingkan atau dikombinasi dengan terapi konvensional.
- 4) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara *in vivo* pada model hewan coba.



## DAFTAR PUSTAKA

Adnyana DPA, Meles IDK, dan Meles W. 2012. Alkaloid Fraction of Jarong (*Achyranthes aspera* Linn) Leaf Induced Apoptosis Breast Cancer Cell Through p53 Pathways. (Abstract). *Advances in Natural & Applied Sciences*, 2012, vol.6 issue 2, p124.

American Association for Cancer Research. AACR Cancer Progress Report 2013. Making Research Count for Patients : A Continual Pursuit. *Clin Cancer Res*, 2013, 19 (Supplement 1) : S1-S88.

ACS. 2012. *Fluorouracil (5-FU)*. <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/guidetocancerdrugs/fluorouracil>.

American Cancer Society (ACS). 2013a. *Breast Cancer : Early Detection*. [www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003165-pdf.pdf](http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003165-pdf.pdf).

ACS, 2013b. *How Is Breast Cancer Treated ?*. <http://www.cancer.org/cancer/%20breastcancer/detailedguide/breast-cancer-treating-general-info>.

ACS. 2013c. *Surgery for Breast Cancer*. <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-treating-surgery>.

ACS. 2013d. *Radiation Therapy for Breast Cancer*. <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-treating-radiation>.

ACS. 2013e. *Chemotherapy for Breast Cancer*. <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-treating-chemotherapy>.

ACS. 2013f. *Hormone Therapy for Breast Cancer*. <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-treating-hormone-therapy>.

ACS. 2013g. *Targeted Therapy for Breast Cancer*. <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-treating-targeted-therapy>.

Ahmed M, Khan MI, Khan MR, Muhammad N, Khan AU, dan Khan RA. 2013. Role of Medicinal Plants in Oxidative Stress and Cancer, 2 : 641.

Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, dan Claderwood SK. 2002. Novel Signal Transduction Pathway Utilized by Extracellular Hsp70 : Role of Toll-Like Receptor (TLR) 2 and TLR4, *J. Bio. Chem.*, 277 : 15028-15034.

- Balachandran P dan Govindarajan R. 2005. Cancer : An Ayurvedic Perspective. *Pharmacological Research*, 51 : 19-30.
- Bandar H, Hijazi A, Rammal H, Hachem A, Saad Z, dan Badram B. 2013. Techniques for the Extraction of Bioactive Compounds from Lebanese *Urtica dioica*. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 1 (6) : 507-513
- Barile, FA. 2013. Principles of Toxicology Testing, Second Edition. Boca Raton : CRC Press.
- Berkovich L, Earon G, Ron I, Rimmon A, Vexler A, dan Shahr L. 2013. *Moringa oleifera* Aqueous Leaf Extract Down-Regulates Nuclear Factor-kappaB and Increase Cytotoxic Effect of Chemotherapy in Pancreatic Cancer Cell. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13 : 212
- Budiman A, Khambri D, dan Bachtiar H. 2013. Faktor yang Mempengaruhi Kepatuhan Berobat Pasien yang Diterapi dengan Tamoxifen setelah Operasi Kanker Payudara. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 2 (1).
- Casado P, Zuazua-Villar P, Prado MA, Eva del Valle, Iglesias JM, Martinez-Campa C, Lazo PS, dan Ramos S. 2007. Characterization of Hsp27 Phosphorylation Induced by Microtubule Interfering Agents : Implication of p38 Signalling Pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 461 : 123-129
- Cavallucci V dan D'Amelio M. 2010. Physiological and Pathological Role of Apoptosis. *Apoptosome : An up-and-coming Therapeutical Tool*
- Chaves M, Eissing T, dan Allgower F. 2009. Regulation of Apoptosis via the NFkB Pathway : Modeling and Analysis. *Dynamics On and Of Complex Networks, Applications to Biology, Computer Science, and the Social Sciences*, Springer
- Chen S, Nieh S, Jao S, Liu C, Wu C, Chang Y, Yang C, dan Lin Y. 2012. Quercetin Suppresses Drug-Resistant Spheres via the p38 MAPK-Hsp27 Apoptotic Pathway in Oral Cancer Cells. *PLoS ONE*, 7 (11) : e49275
- Cheng TC, Lu JF, Wang JS, Lin LJ, Kuo HI, dan Chen BH. 2011. Antiproliferation Effect and Apoptosis Mechanism of Prostate Cancer Cell PC-3 by Flavonoid and Saponins Prepared from *Gynostemma Pentaphyllum*. (Abstract). *J Agric Food Chem*, 2011, 59(20): 11319-29
- Darzynkiewicz Z, Galkowski D, dan Zhao H. 2008. Analysis of Apoptosis by Cytometry Using TUNEL Assay. *Method*, 44 (3) : 250-254



- Deng C. 2006. BRCA1 : Cell Cycle Checkpoint, Genetic Instability, DNA Damage Response and Cancer Evolution. *Nucleic Acids Research*, 34 (5)
- Dipiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, dan Posey LM. 2008. *Pharmacotherapy, A Pathophysiologic Approach, Seventh Edition*, Mc Graw Hill, New York
- Erber, Wendy M. 2010. *Diagnostic Techniques in Hematological Malignancies*. London : Cambridge University Press.
- Fauzee NJS, Dong Z, dan Wang Y. 2011. Review Taxanes: Promising Anti-Cancer Drugs. *Asian Pasific Journal of Cancer Prevention*, 12
- Gany ZSA dan Mohammed MH. 2011. Low Concentration of Pomegranate Rind Extract Influence : Proliferation, Cytotoxicity and Apoptosis in Cancer Cell Lines. *Iraqi J. Comm. Med.*, 2011 (1).
- Goyal BR, Agrawal BB, Goyal RK, dan Mehta AA. 2007. Phyto-pharmacology of *Moringa oleifera* Lam.ó, An Overview. *Natural Product Radiance*, 6 (4), pp.347-353
- Handa SS. 2008. An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*.
- Hardouin J, Canelle L, Vlieghe C, Lasserre J, Caron M, dan Joubert-Caron R. 2006. Proteomic Analysis of the MCF7 Breast Cancer Cell Line. *Cancer Genomics & Proteomics*, 3 : 355-368
- Hermawan A, Nur KA, Sarnoko, Dewi D, Putri P, dan Meiyanto E. 2012. Ethanolic Extract of *Moringa oleifera* Increased Cytotoxic Effect of Doxorubicin on HeLa Cancer Cells. *Journal of Natural Remedies*, 12/2 : 108-114.
- Globocan, International Agency for Research on Cancer (IARC). 2008. *Estimated Cancer Incidence, Mortality, Prevalence, and Disability-Adjust Life Years Worldwide in 2008*.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, dan Forman D. 2011. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*, 61 : 69-90.
- Kanagasabai R, Karthikeyan K, Vedam K, Qien W, Zhu Q, dan Ilangovan G. 2010. Hsp27 Protects Adenocarcinoma Cells from UV-Induced Apoptosis by Akt and p21-Dependent Pathways of Survival. *Molecul Cancer Research*, 8 (10)



- Kanagasabai R, Karthikeyan K, Vedam K, Qien W, Zhu Q, dan Ilangovan G. 2011. Forced Expression of Heat Shock Protein 27 (Hsp27) Reverses P-Glycoprotein (ABCB1)-mediated Drug Efflux and MDR1 Gene Expression in Adriamycin-resistant Human Breast Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 286 : 33289-33300
- Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M, dan Kioussi C. 2012. Detection of Apoptosis by TUNEL Assay. (Abstract). *Method Mol Biol*, 887:41-7
- Leelawat S dan Leelawat K. 2014. *Moringa oleifera* Extracts Induce Cholangiocarcinoma Cell Apoptosis by Induction of Reactive Oxygen Species Production. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 2014; 6(2); 183-189
- Li K, Li Q, Han Z, Li J, Gao D, Liu Z, dan Zheng F. 2008. Alkaloid from *Angelica dahuricae* Inhibits HeLa Cell Growth by Inducing Apoptosis and Increasing Caspase-3 Activity. *LABMEDICINE*, volume 39, number 9.
- Maeda S. 2010. NF $\kappa$ B, JNK, and TLR Signaling Pathways in Hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology Research and Practice*, 2010.
- Murnan EJ. 2009. Post-Translational Modification and Regulation of the Chaperone Hsp27 during Apoptosis. *Thesis*. Ohio State University. Columbus, USA
- Nair S dan Varalakshmi K.N. 2013. Anticancer, Cytotoxic Potential of *Moringa oleifera* Extracts on HeLa Cell Line. *Journal of Natural Pharmaceuticals*, 2 (3)
- Navle S dan Csurhes S. 2010. Weed Risk Assesment, Horseradish Tree, *Moringa oleifera*, Queensland Government, Brisbane
- Nazir M. 2004. Metode Penelitian. Jakarta : Ghalia Indonesia
- Nethercott HE, Brick DJ, dan Schwartz PH. 2011. Immunocytochemical Analysis of Human Pluripotent Stem Cells. *Methods Mol Biol*, 767 : 201-220
- Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, Bauzi L, Mini E, dan Capaccioli S. 2009. Natural Compounds for Cancer Treatment and Prevention. *Pharmacological Research*, 59 : 365-378.
- Paliwal R, Sharma V, dan Pracheta. 2011. A Review on Horse Radish Tree (*Moringa oleifera*): A Multipurpose Tree with High Economic and Commercial Importance. *Asian Journal of Biotechnology*, 3 (4) : 317-328

- Pamok S, Saenphet S, Vinitketkumnuen U, dan Saenphet K. 2012. Antiproliferative Effect of *Moringa oleifera* Lam. And *Pseuderanthum palatiferum* (Nees) Radlk Extracts on The Colon Cancer Cells. *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol. 6(1), pp. 139-145, 2012
- Porcher Michel H. *et al.* 2008. 1995-2020, Sorting Moringa Names. Multilingual Multiscript Plant Name Database. School of Agriculture and Food Systems. Faculty of Land & Food Resources. The University of Melbourne. Australia. <http://www.plantnames.unimelb.edu.au/Sorting/Moringa.html>
- Preobrazhenskaya MN, Anna NT, Eugenia NO, Huang K, dan Huang H. 2006. Second Generation Drugs-derivatives of Natural Antitumor Anthracycline Antibiotics Danorubicin, Doxorubicin and Carcinomycin. *J Med Sci*, 26 (4) : 119-128
- Putra A, Tjahjono, dan Winarto. 2011. Ekstrak Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme*) Fraksi Diklorometanolik dan Ekspresi Caspase-3 dan p21 *Cell-Line* Kanker Payudara MCF-7. *Media Medika Indonesia*, 2011
- Price ML. 2007. The Moringa Tree. [http://chenetwork.org/files\\_pdf/Moringa.pdf](http://chenetwork.org/files_pdf/Moringa.pdf)
- Rahmawati R. 2013. Pengaruh Ekstrak Metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Ekspresi Hsp25 pada Karsinogenesis Kolon Tikus Wistar yang Diinduksi 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA). Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang
- Rerole AL, Joly AL, Thuringer D, dan Garrido C. 2010. Hsp70 and Hsp27 : Emerging Targets in Cancer Therapy. *Apoptosome : An up-and-coming Therapeutical Tool*
- Ridnour LA, Chen RY, Switzer CH, Heinecke JL, Amb S, Glynn S, Young HA, Trinchieri G, dan Wink DA. 2009. Molecular Pathways : Toll-like Receptors in the Tumor Microenvironment—poor Prognosis or New Therapeutic Opportunity. *Clin Cancer Res*, 19 (6) : 1340-6
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ, dan Minor L. 2013. Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual*
- Ruddon RW. 2007. Cancer Biology, Fourth Edition, Oxford University Press, New York
- Rusak G, Gutzeit HO, dan Ludwig-Müller. 2002. Effects of Structurally Related Flavonoids on hsp Gene Expression in Human Promyeloid Leukaemia Cells. *Food Technol. Biotechnol*, 40 (4) 267-273, 2002

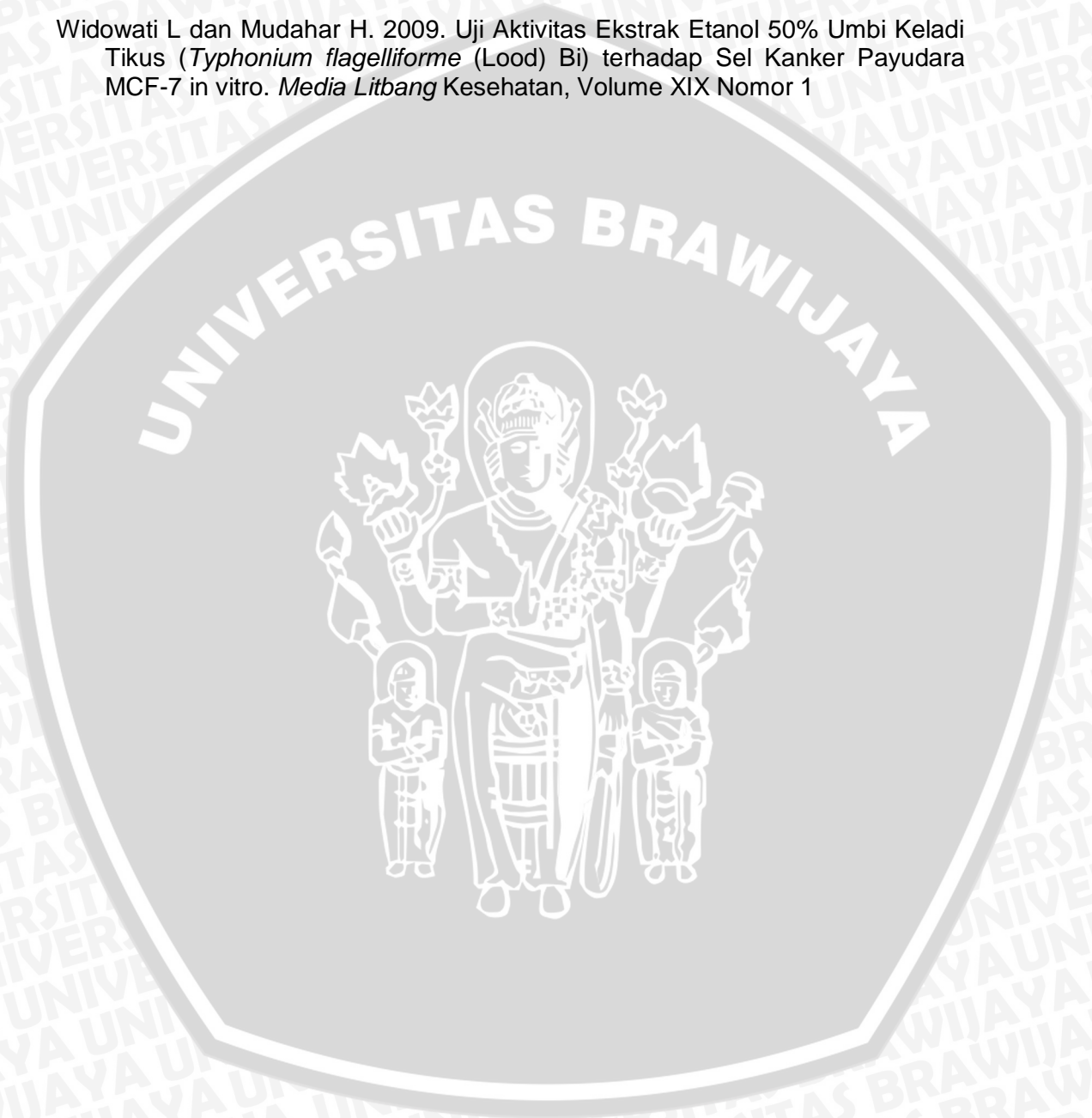


- Roopalatha UC dan Nair VM. 2013. Phytochemical Analysis of Successive Reextracts of The Leaves of *Moringa oleifera* LAM. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol 5, Suppl 3, 2013
- Saetung A, Itharat A, Dechsukum C, Wattanapiromsakul C, Keawpradub N, dan Ratanasuwan. 2005. Cytotoxic Activity of Thai Medicinal Plants for Cancer Treatment. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 27 (Suppl.2)
- Sato Y, Goto Y, Narita N, dan Hoon DSB. 2009. Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron*, 2 (Suppl 1) : 205-214
- Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, dan Heber D. 2005. In Vitro Antiproliferative, Apoptotic and Antioxidant Activities of Punicalagin, Ellagic Acid and a Total Pomegranate Tannin Extract are Enhanced in Combination with Other Polyphenols as found in Pomegranate Juice. (Abstract). *J Nutr Biochem*, 2005; 16 (6): 360-7.
- Shahriar M, Hossain MI, Bahar ANM, Akhter S, Haque MA, dan Bhuiyan MA. 2012. Preliminary Phytochemical Screening, *In-Vitro* Antioxidant and Cytotoxic Activity of Five Different Extracts of *Moringa oleifera* Leaf. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 02 (05) : 65-68.
- Singh N, Nigam M, Ranjan V, Sharma R, Balapure AK, dan Rath SK. 2009. Caspase Mediated Enhanced Apoptotic Action of Cyclophosphamide- and Resveratrol-Treated MCF-7 Cells. *J Pharmacol Sci*, 109 (4) : 473-85
- Tiloke C, Alisa P, dan Anil AC. 2013. The Antiproliferative Effect of *Moringa oleifera* Crude Extract on Cancerous Human Alveolar Epithelial Cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13:226
- Van Merloo J, Kaspers GJ, dan Cloos J. 2013. Cell Sensitivity Assays. *Method Mol Biol*. 2011; 731:273-45.
- Vidyasagar A, Wilson NA, dan Djamali A. 2012. Heat Shock Protein 27 (Hsp27) : Biomarker of Disease and Therapeutic Target. *Fibrogenesis and Tissue Repair*, 5:7
- Vinoth B, Manivasagaperumal R, dan Balamurugan S. 2012. Phytochemical Analysis and Antibacterial Activity of *Moringa Oleifera* LAM. *International Journal of Research in Biological Sciences*, 2012; 2(3):98-102
- Wang EL, Qian ZR, Nakasono M, Tanahashi T, Yoshimoto K, Bando Y, Kudo E, Shimada M, dan Sano T. 2010. High Expression of Toll-like Receptor 4/myeloid Differentiation Factor 88 Signals Correlates with Poor Prognosis in Colorectal Cancer. *Br J Cancer*, 102 (5) : 908-915



Wei L, Tsung-Ta L, Hsiu-Huan W, Hui-Mei, Alice LY, Hsiang-Pu F, dan Wen-Wei C. Hsp27 Participates in the maintenance of Breast Cancer Stem Cells through Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition and Nuclear Factor- $\kappa$ B. *Breast Cancer Research*, 2011, 13-R 101

Widowati L dan Mudahar H. 2009. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 50% Umbi Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lood) Bi) terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 in vitro. *Media Litbang Kesehatan*, Volume XIX Nomor 1



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

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Erita Rahmani

NIM : 105070500111017

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, bukan merupakan hasil pengambil-alihan semua gagasan dan tulisan orang lain. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 24 Juni 2014

Yang membuat pernyataan

Erita Rahmani

105070500111017

Lampiran 2 Keterangan Kelaikan Etik



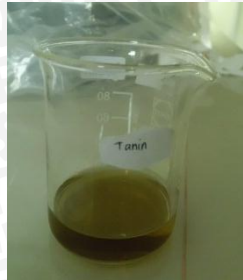


Lampiran 3 Determinasi Daun Kelor (*Moringa oleifera*)



#### Lampiran 4 Hasil Pengamatan Uji Fitokimia

##### 1. Pengamatan Kandungan Tanin



Kandungan tannin ditandai dengan terbentuknya warna biru kehitaman pada larutan ekstrak.

##### 2. Pengamatan Kandungan Saponin



Kandungan saponin ditandai dengan terbentuknya lapisan busa dengan tebal  $\pm 1$  cm yang stabil selama 10 detik.

##### 3. Pengamatan Kandungan Flavonoid



Kandungan flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning setelah ditambahkan 5% NaOH sebanyak 5 tetes (gambar sebelah kiri) dan warna kuning yang memudar setelah ditambahkan 2M HCl (gambar sebelah kanan).

##### 4. Pengamatan Kandungan Terpenoid



Kandungan terpenoid ditandai dengan terbentuknya warna coklat kemerahan pada permukaan larutan ekstrak yang telah diberikan kloroform dan  $H_2SO_4$ . Namun, pada hasil pengamatan tidak terbentuk warna tersebut sehingga disimpulkan bahwa ekstrak tidak mengandung terpenoid.

#### 5. Pengamatan Kandungan Alkaloid

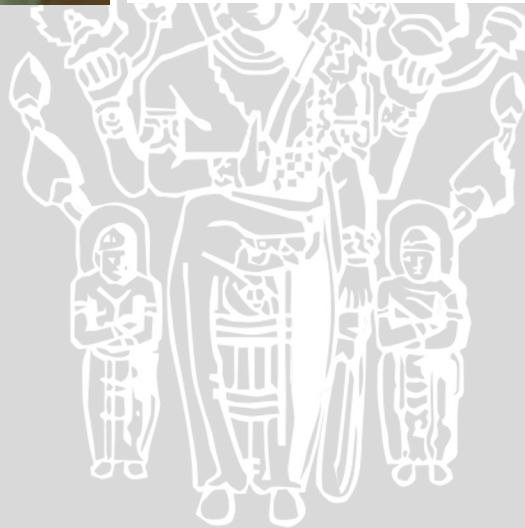


Kandungan Alkaloid ditandai dengan timbulnya warna oranye kecoklatan pada larutan ekstrak (cairan sebelah atas).

#### 6. Pengamatan Kandungan Fenol



Kandungan Fenol ditandai dengan terbentuknya warna hijau kehitaman pada larutan ekstrak.





**Lampiran 5 Hasil Perhitungan Indeks Ekspresi Hsp27**

Perlakuan	Lapang	Replikasi 1		Replikasi 2		Replikasi 3		Replikasi 4		Replikasi 5		Replikasi 6		
		Hsp27	Total Sel	Hsp27	Total Sel	Hsp27	Total Sel	Hsp27	Total Sel	Hsp27	Total Sel	Hsp27	Total Sel	
Kontrol	1	8	8	6	6	8	8	40	40	18	18	14	14	
	2	13	13	23	23	6	6	10	7	18	18	27	27	
	3	15	15	26	26	6	10	7	7	22	22	16	31	
	4	7	7	11	11	12	12	20	20	32	32	13	36	
	5	7	7	27	27	15	16	12	12	29	29	26	33	
	6	24	24	17	17	17	18	12	18	16	16	30	30	
	7	11	11	21	21	6	6	15	20	27	27	29	29	
	8	9	9	11	11	20	23	9	15	33	33	33	33	
	9	9	9	19	21	7	7	11	25	27	27	32	32	
	10	7	7	25	25	32	32	7	10	8	8	27	27	
	Total		110	110	186	188	129	138	143	174	230	230	247	292
	Indeks		100		98.936		93.478		82.184		100		84.589	
1100 µg/ml	1	4	4	7	13	11	11	27	27	5	10	27	27	
	2	5	5	11	11	31	31	26	26	16	28	18	18	
	3	13	13	9	16	46	46	44	44	22	22	24	24	
	4	7	14	23	23	14	31	21	21	17	17	30	30	
	5	8	10	22	22	16	34	17	17	15	15	16	16	
	6	0	6	7	7	39	39	16	16	12	12	4	18	
	7	4	4	53	53	36	46	11	11	33	33	17	17	
	8	10	14	20	30	29	29	7	7	13	13	11	11	
	9	5	5	21	21	17	17	10	10	10	10	0	8	
	10	2	5	11	11	45	45	22	28	16	16	14	14	
	Total		58	80	184	207	284	329	201	207	159	176	161	183
	Indeks		72.5		88.889		86.322		97.101		90.341		87.978	

2200 µg/ml	1	10	15	13	13	12	12	0	20	17	26	2	6
	2	20	28	1	10	0	45	15	37	10	10	4	11
	3	18	18	6	16	4	25	10	36	0	8	8	17
	4	17	17	11	11	11	11	25	25	5	11	15	15
	5	8	10	20	30	19	25	25	25	9	14	17	43
	6	10	10	15	15	24	39	8	12	15	15	0	11
	7	2	21	20	32	14	14	0	45	9	19	24	36
	8	2	5	20	20	19	26	4	31	4	14	0	5
	9	6	14	15	18	30	32	6	20	8	12	17	17
	10	13	13	4	26	16	36	28	41	3	17	19	31
	Total	106	151	125	191	149	265	121	292	80	146	106	192
Indeks	70.20		65.45		56.23		41.438		54.795		55.21		
4400 µg/ml	1	13	13	7	7	3	6	14	14	10	20	8	8
	2	13	16	15	15	3	7	0	22	24	37	10	10
	3	6	7	9	9	8	20	14	16	0	6	8	8
	4	2	13	9	9	8	11	5	9	7	8	5	5
	5	7	7	21	21	4	10	11	22	8	17	13	13
	6	1	9	12	12	3	9	0	7	7	15	0	21
	7	4	6	3	8	8	20	6	8	8	8	4	11
	8	12	13	6	8	0	5	14	14	1	16	22	22
	9	25	25	2	13	13	22	4	17	5	14	15	15
	10	11	16	0	9	8	8	0	5	5	5	0	6
	Total	94	125	84	111	58	118	68	134	75	146	85	119
Indeks	75.20		75.68		49.15		50.75		51.37		71.43		

Lampiran 6 Hasil Perhitungan Indeks Apoptosis

Perlakuan	Lapang Pandang	Replikasi 1		Replikasi 2		Replikasi 3		Replikasi 4		Replikasi 5		Replikasi 6	
		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		25		20		20	
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		92.86		95.65	



**Lampiran 7 Uji Normalitas, Uji Homogenitas, dan Uji Spearman Penentuan IC<sub>50</sub>**  
menggunakan MTT Assay

1. Uji Normalitas

**Tests of Normality**

	DosisEkstrak	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
PersenKematianSel	kontrol	.196	3	.	.996	3	.879
	1200	.327	3	.	.873	3	.303
	1250	.364	3	.	.800	3	.114
	1400	.328	3	.	.871	3	.298
	1600	.176	3	.	1.000	3	.982
	1800	.293	3	.	.922	3	.459
	2000	.253	3	.	.964	3	.637
	2200	.220	3	.	.987	3	.779
	2400	.284	3	.	.934	3	.503
	2500	.245	3	.	.971	3	.672
	2600	.385	3	.	.750	3	.000
	2800	.354	3	.	.821	3	.165
	3000	.328	3	.	.870	3	.296
	3200	.306	3	.	.905	3	.401
	3400	.278	3	.	.940	3	.527
	3600	.235	3	.	.978	3	.714
	3800	.175	3	.	1.000	3	.996
4000	.385	3	.	.750	3	.000	
4200	.369	3	.	.789	3	.088	
4400	.274	3	.	.944	3	.546	

a. Lilliefors Significance Correction

**Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
PersenKematianSel	.175	60	.000	.896	60	.000

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

**Test of Homogeneity of Variances**

PersenKematianSel

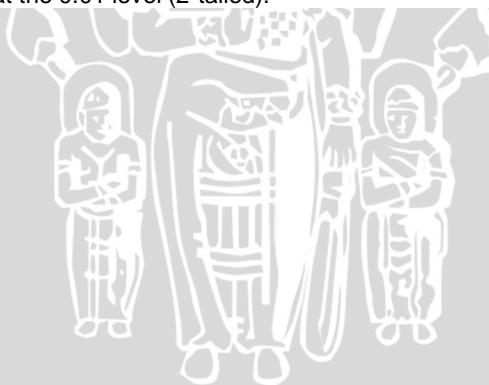
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.775	19	40	.000

3. Uji Spearman

**Correlations**

		DosisEkstrak	PersenKematianSel
Spearman's rho	Correlation Coefficient	1.000	.950**
	Sig. (2-tailed)	.	.000
	N	60	60
	Correlation Coefficient	.950**	1.000
PersenKematianSel	Sig. (2-tailed)	.000	.
	N	60	60

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



**Lampiran 8 Uji Normalitas, Uji Homogenitas, Uji ANOVA, Uji Post Hoc , dan Uji Pearson Pengujian Ekspresi Hsp27 Menggunakan Metode Imunositokimia**

1. Uji Normalitas

**Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IndeksEkspresiHsp27	.138	24	.200*	.934	24	.121

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

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

**Test of Homogeneity of Variances**

IndeksEkspresiHsp27

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.286	3	20	.110

3. Uji ANOVA

**ANOVA**

IndeksEkspresiHsp27

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5748.490	3	1916.163	19.162	.000
Within Groups	1999.996	20	100.000		
Total	7748.486	23			



4. Uji Post Hoc

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: IndeksEkspresiHsp27

Tukey HSD

(I) Dosis	(J) Dosis	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	1100	6.01000	5.77350	.728	-10.1497	22.1697
	2200	35.97833*	5.77350	.000	19.8187	52.1380
	4400	30.93500*	5.77350	.000	14.7753	47.0947
1100	kontrol	-6.01000	5.77350	.728	-22.1697	10.1497
	2200	29.96833*	5.77350	.000	13.8087	46.1280
	4400	24.92500*	5.77350	.002	8.7653	41.0847
2200	kontrol	-35.97833*	5.77350	.000	-52.1380	-19.8187
	1100	-29.96833*	5.77350	.000	-46.1280	-13.8087
	4400	-5.04333	5.77350	.818	-21.2030	11.1163
4400	kontrol	-30.93500*	5.77350	.000	-47.0947	-14.7753
	1100	-24.92500*	5.77350	.002	-41.0847	-8.7653
	2200	5.04333	5.77350	.818	-11.1163	21.2030

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

5. Uji Pearson

**Correlations**

		Dosis	IndeksEkspresiHsp27
Dosis	Pearson Correlation	1	-.764**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	24	24
IndeksEkspresiHsp27	Pearson Correlation	-.764**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	24	24

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



**Lampiran 9** Uji Normalitas, Uji Homogenitas, Uji ANOVA, Uji Post Hoc, dan Uji Pearson Pengujian Apoptosis menggunakan TUNEL Assay

1. Uji Normalitas

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

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

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

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

3. Uji One Way ANOVA

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

4. Uji Post Hoc

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Apoptosis

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

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





5. Uji Pearson

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

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

