

**Efek Ekstrak Ethanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*)
Terhadap Ekspresi *Toll-like Receptor 4* (TLR4) dan
Apoptosis Sel Kanker Payudara MCF-7**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi**



Oleh:

Indah Lestari

NIM: 1050705001110015

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

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

EFEK EKSTRAK ETHANOL DAUN KELOR (*Moringa oleifera*) TERHADAP
EKSPRESI TOLL-LIKE RECEPTOR 4 (TLR4) DAN APOPTOSIS SEL KANKER
PAYUDARA MCF 7

Oleh:

Indah Lestari

NIM : 105070500111015

Telah diuji pada

Hari : Kamis

Tanggal : 26 Juni 2014

dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

Dra. Diana Lyrawati, Apt, MSc., PhD

NIP. 19681101199303 2004

Penguji II/ Pembimbing I

dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, Sp.M.,

NIP. 196701231996011001

Penguji III/Pembimbing II

Dr. Dra. Sri Winarsih.,Apt, MSi

NIP.195408231981032001

Mengetahui,

Kepala Program Studi Farmasi

Drs. Bambang Sidharta, MS., Apt.

NIP. 19481216 198002 1 001

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaiukum Warahmatullahi Wabarrakatuh

Alhamdulillah, Puji Syukur penulis panjatkan ke Hadirat Allah *Subhanahu wa Ta'ala* yang telah memberikan kelancaran dan kemudahan sehingga penulis bisa menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul ' Efek Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Ekspresi Toll-like Receptor 4 (TLR4) dan Apoptosis Sel Kanker Payudara MCF-7' ini dengan baik.

Tugas Akhir ini tidak akan mungkin terselesaikan tanpa doa, bantuan, bimbingan, motivasi, serta dukungan dari beberapa pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terimakasih yang tak terhingga kepada :

1. Dr. Dr. Karyono M, SpPA, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
2. Drs. Bambang Sidharta selaku Ketua Jurusan Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
3. Dra. Diana Lyrawati, Apt., M.S., Ph.D selaku dosen penguji yang telah bersedia meluangkan waktunya untuk menguji dan segala masukan yang sangat berarti.
4. dr.Hidayat Sujuti, Phd, SpM selaku dosen pembimbing pertama yang senantiasa sabar memberikan masukan, bimbingan, bantuan dan semangat selama penulisan Tugas Akhir ini

5. Dr. Dra. Sri Winarsih., Apt, Msi selaku dosen pembimbing kedua yang senantiasa dengan sabar mendampingi, membimbing, memberi masukan dan semangat hingga akhirnya penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
6. Pak Wibi Riawan atas pemberian TUNEL Assay dan waktu yang diluangkan selama peneliti melakukan penelitian di Laboratorium Biokimia sehingga penelitian ini dapat terlaksana.
7. Segenap dosen FKUB, khususnya dosen Farmasi Brawijaya atas segala ilmu yang telah diberikan.
8. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB atas bantuannya.
9. Keluarga besar saya tercinta, khususnya Papa saya Mufid Hidayat, Mama saya Sulastiningsih, Adik-adik saya Icha dan Anty, serta keluarga besar Nenek Siti Sahara atas segala perhatian dan kasih sayang, doa serta dukungan lahir dan batin yang senantiasa mengiringi jejak langkahku.
10. Teman-teman satu tim penelitian saya, “Moringa’s Team” yang selalu kompak sehingga penelitian ini berjalan dengan lancar: Abni Rachmi, Erita Rahmani, Nabila Andjani, dan Riska Rosida. Semoga kita makin kompak, meskipun penelitiannya sudah berakhir.
11. Sahabat-sahabat saya tersayang Diki Yordan, Fariz Izzan, Wiranto, Ramdhani Bima, Gita Permana, Nida Nafisah, Choirul Huda, galib Muttaqin, Ikhsanti Tri Yunita, Syarifatul Imamah, Mutia Puspitasari, Nina Silviana, Alfi L.R dan juga Mas Aldilla Lugas Kusuma, serta semua

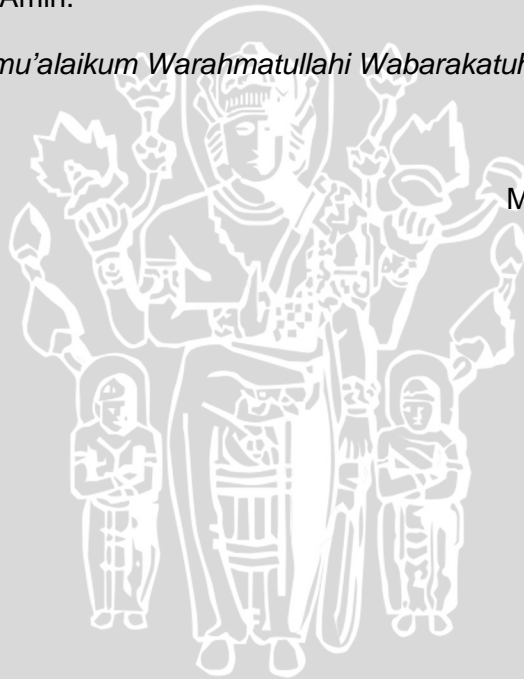
teman-teman dan berbagai pihak yang tidak dapat disebutkan satu demi satu yang telah bersedia menemani dan mendukung sehingga Tugas Akhir ini dapat terselesaikan dengan baik.

Penulis menyadari bahwa Tugas Akhir ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun. Akhir kata, semoga Tugas Akhir ini dapat memberikan manfaat bagi penulis sendiri maupun bagi pembaca, Amin.

Wassalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Malang, 26 Juni 2014

Penulis



ABSTRAK

Lestari, Indah. 2014. **Efek Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Ekspresi *Toll-like Receptors 4* (TLR4) dan Apoptosis Sel Kanker Payudara MCF-7.** Tugas Akhir, Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pembimbing: (1) dr. Hidayat Sujuti, Phd, SpM (2) Dr.Dra. Sri Winarsih, Apt, MSi

Ekspresi TLR4 (parameter apoptosis kanker) dapat mengakibatkan peningkatan proliferasi, diferensiasi sel, dan penurunan apoptosis. Daun kelor (*Moringa oleifera*) mengandung senyawa flavonoid glikosida quersetin dan secara ayurveda telah terbukti sebagai antikanker. Tujuan penelitian adalah membuktikan bahwa pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menghambat aktivitas sel kanker payudara MCF-7. Penelitian menggunakan *True experimental in vitro design* pada kultur sel MCF-7 yang diberikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan dosis 1100 µg/ml, 2200 µg/ml, 4400 µg/ml, dan kelompok kontrol. Perhitungan jumlah sel yang mengekspresikan TLR4 ditentukan dengan imunositokimia, dan sel yang mengalami apoptosis dideteksi menggunakan TUNEL Assay. Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan pemberian dosis ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menyebabkan penurunan ekspresi TLR4 signifikan dengan nilai $p = 0.000$ ($p < 0.05$). Besar ekspresi TLR4 pada dosis 1100 µg/ml = 38.62%, 2200 µg/ml = 21.33%, dan 4400 µg/ml = 26.55%. Hasil korelasi menunjukkan $r = -0.748$, yaitu ada korelasi yang signifikan antara dosis ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan penurunan jumlah sel yang mengekspresikan TLR4. Semakin tinggi dosis yang diberikan, semakin rendah jumlah TLR4 yang tersekrepsi pada sel yaitu nilai $p = 0.000$ ($p < 0.01$). Tidak dapat dilihat apoptosis dari sel MCF-7 secara jelas diduga karena ada sel yang mengalami nekrosis atau kesalahan yang terjadi saat pemberian perlakuan. Hasil TUNEL Assay pada setiap dosis menunjukkan ada perbedaan warna pada sel yang diberi perlakuan dosis berbeda. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan ekspresi TLR4, dosis IC_{50} yang diperoleh 2200 µg/ml dan dosis 2200 µg/ml mampu menurunkan ekspresi TLR4 terbesar dengan presentase ekspresinya 21.33%. Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) cenderung meningkatkan apoptosis sel MCF-7.

Kata kunci : *Moringa oleifera*, sel MCF-7, ekspresi TLR4, apoptosis

ABSTRACT

Lestari, Indah. 2014. **Effect Ethanolic Extract Of Drumstick Leaves (*Moringa oleifera*) Toward Toll-like Receptors 4 (TLR4) Expression and Apoptosis Breast Cancer Cell-line MCF-7**. Final Assignment, Pharmacy Program, Faculty of Medicine Brawijaya University Malang. Supervisors: (1) dr. Hidayat Sujuti, Phd, SpM (2) Dr.Dra. Sri Winarsih, Apt, MSi.

Expression of TLR4 (parameter of apoptosis) can induce proliferation, cell differentiation, and inhibition of apoptosis. Drumstick (*Moringa oleifera*) leaves contains flavonoid glicosidic quercetin which had been found to have an anticancer activity in Ayurveda. The aimed of this research was to give evidence that extract of drumstick (*Moringa oleifera*) leaves can inhibit breast cancer cell-line MCF-7. This research was using a *True experimental in vitro design* to MCF-7 cells culture with a drumstick (*Moringa oleifera*) leaves extract dose of 1100 µg/ml, 2200 µg/ml, 4400 µg/ml, and control group. Calculation of cells which express the TLR4 was determined by immunocytochemistry, and apoptosis was determined by TUNEL Assay. The result showed that higher dose of Drumstick (*Moringa oleifera*) leaves extract can reduce of TLR4 expression significantly ($p= 0.000$). Number of TLR4 expression with dose 1100 µg/ml = 38.62%, 2200 µg/ml = 21.33%, and 4400 µg/ml = 26.55%. Correlation test results demonstrated a significant correlation ($r = -0.748$), demonstrated a significant correlation between the dose of Drumstick (*Moringa oleifera*) leaves extract by the TLR4 expression in cell. Higher dose of Drumstick (*Moringa oleifera*) leaves extract, gave lower cell number that express TLR4 ($p= 0.000$) ($p < 0.01$). Apoptosis MCF-7 cell can not be seen clearly, estimated because the cells undergo necrosis or errors that occur when giving treatment. Result of TUNEL Assay showed that there are color differentiation of cell in each doses that given. Conclusion of this research is drumstick (*Moringa oleifera*) leaves extract can reduce TLR4 expression. Dose of IC_{50} is 2200 µg/ml, and the dose have the largest effect of reduce TLR4 expression with the percentage is 21,33%. Drumstick (*Moringa oleifera*) leaves extract has willingness to increase apoptosis of MCF-7 cell.

Keywords : *Moringa oleifera*, MCF-7 cells, TLR4 expression, apoptosis

DAFTAR ISI

	Halaman
Judul.....	i
Lembar Pengesahan	ii
Kata Pengantar.....	iii
Abstrak	vi
Abstract	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Tabel.....	xiv
Daftar Gambar	xv
Daftar Lampiran.....	xvi
Daftar Singkatan	xviii
 BAB 1 PENDAHULUAN	
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	4



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker	5
2.1.1 Definisi Kanker	5
2.2 Kanker Payudara	6
2.2.1 Epidemiologi	6
2.2.2 Faktor Risiko	6
2.2.3 Patofisiologi	10
2.2.4 Klasifikasi	12
2.2.5 Tanda dan Gejala	12
2.2.6 Stadium Kanker	13
2.2.7 Sel MCF-7	15
2.3 Toll-like Receptor 4 (TLR4)	15
2.4 Hubungan TLR4 dan Kanker Payudara	19
2.5 Apoptosis	21
2.6 Kelor (<i>Moringa oleifera</i>)	25
2.6.1 Taksonomi	25
2.6.2 Daun kelor	25
2.6.3 Flavonoid	26

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian	30
3.2 Hipotesis Penelitian	32



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian	33
4.2 Besar Sampel	33
4.2.1 Penentuan IC ₅₀ Menggunakan MTT Assay	33
4.2.2 Pengujian Ekspresi TLR4 Menggunakan Metode Imunositokimia	34
4.3 Variabel Penelitian	35
4.3.1 Variabel Bebas.....	35
4.3.2 Variabel Terikat	35
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian	35
4.5 Bahan dan Alat Penelitian	35
4.5.1 Kultur Sel MCF-7	35
4.5.2 Maserasi	36
4.5.3 Pemaparan Kultur Sel	36
4.5.4 Penentuan Kualitatif Fitokimia.....	36
4.5.5 Penentuan IC ₅₀ Menggunakan MTT Assay	38
4.5.6 Penentuan Ekspresi TLR4 Menggunakan Metode Imunositokimia.....	38
4.5.7 Pengujian Apoptosis dengan Menggunakan Metode Tunel Assay.....	38
4.6 Definisi Istilah/ Operasional	39
4.7 Prosedur Penelitian	39
4.7.1 Kultur Sel MCF-7	39
4.7.1.1 Penumbuhan sel	39

4.7.1.2 Pergantian Media	41
4.7.1.3 Pemanenan Sel	41
4.7.1.4 Perhitungan Sel	42
4.7.1.5 Subkultur Sel	42
4.7.2 Maserasi Daun Kelor	43
4.7.3 Pemaparan Ekstrak Daun Kelor pada Kultur Sel.....	43
4.7.4 Penentuan Kualitatif Fitokimia.....	44
4.7.5 Penentuan IC ₅₀ Menggunakan MTT Assay	45
4.7.6 Pengujian Apoptosis dengan Menggunakan Metode Tunel Assay.....	46
4.7.7 Pengujian Ekspresi TLR4 Menggunakan Metode Imunositokimia.....	47
4.8 Analisis Data	50
4.9 Alur Penelitian.....	52
 BAB 5 HASIL DAN ANALISIS	
5.1 Hasil Penelitian	53
5.1.1 Hasil Ekstraksi dan Uji Fitokimia	53
5.1.2 Penentuan IC ₅₀ (MTT Assay).....	54
5.1.3 Hasil Pengujian Ekspresi TLR4 menggunakan Metode Imunositokimia	57
5.1.4 Hasil Pengujian Apoptosis menggunakan Metode TUNEL Assay	61
5.2 Analisis data	63
5.2.1 Hasil Penentuan IC ₅₀ dengan MTT Assay	63

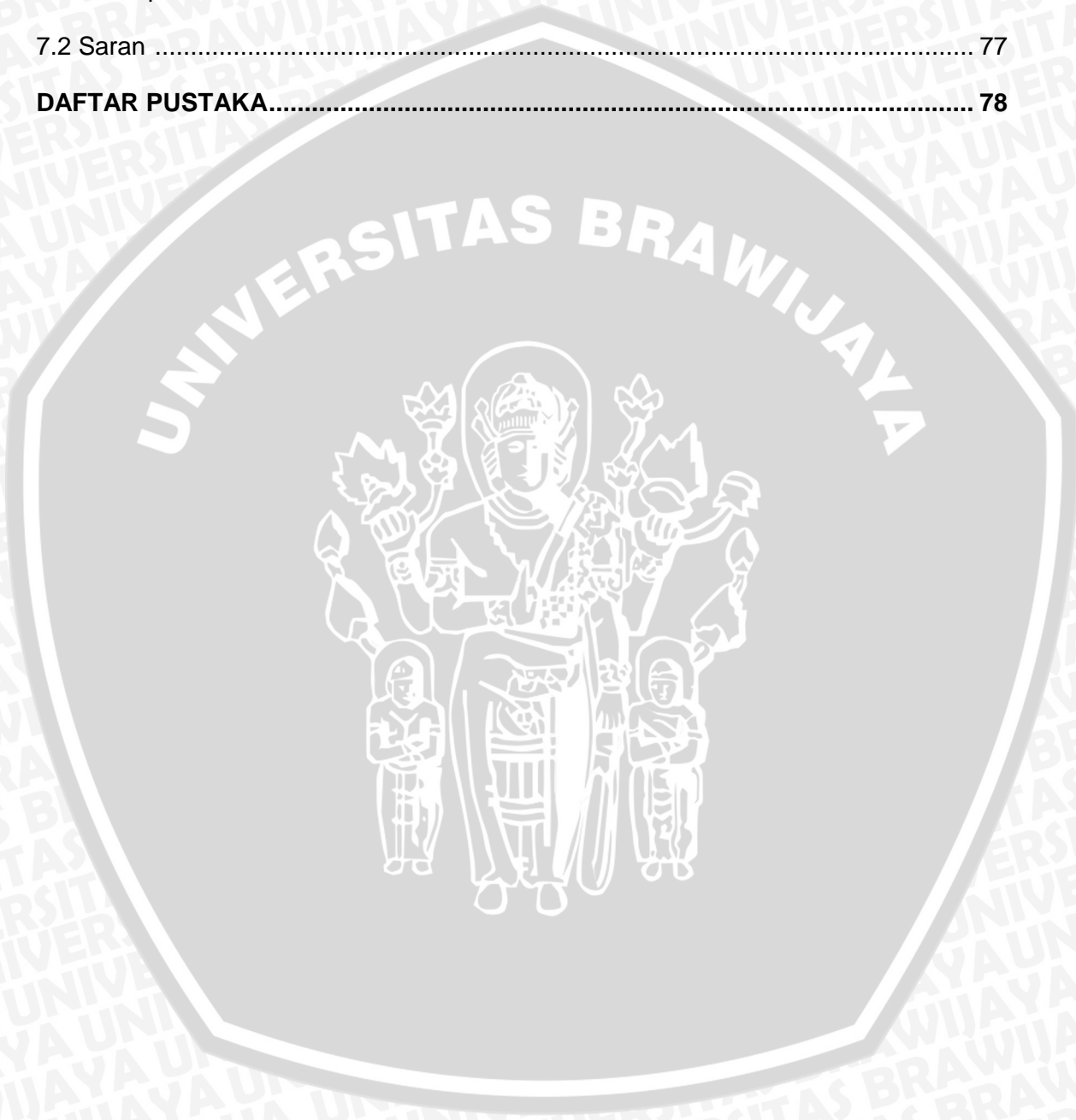
5.2.1.1 Uji Normalitas dan Homogenitas	63
5.2.1.2 Uji Spearman	63
5.2.2 Hasil Pengujian Ekspresi TLR4 menggunakan Metode Imunositokimia	64
5.2.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas	64
5.2.2.2 Uji Kruskal-wallis	65
5.2.2.3 Uji Mann-whitney	65
5.2.2.4 Uji Spearman	65
5.2.3 Hasil Pengujian Apoptosis menggunakan Metode TUNEL Assay	66
5.2.3.1 Uji Normalitas dan Homogenitas	66
5.2.3.2 Uji One-way ANOVA	66
5.2.3.3 Uji Post Hoc	66
5.2.3.4 Uji Pearson	67
BAB 6 PEMBAHASAN	
6.1 Analisis Hasil	68
6.1.1 Uji Fitokimia	68
6.1.2 Uji Penentuan IC ₅₀ (MTT Assay)	71
6.1.3 Pengaruh Ekstrak Daun Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) dan Ekspresi TLR4	73
6.1.4 Pengaruh Ekstrak Daun Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) dan Apoptosis Sel MCF-7	75
6.2 Keterbatasan Penelitian	76

BAB 7 KESIMPULAN

7.1 Kesimpulan..... 77

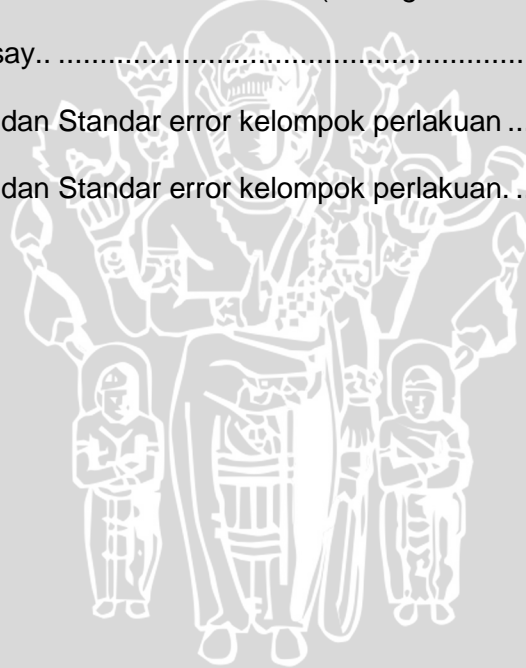
7.2 Saran 77

DAFTAR PUSTAKA..... 78



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Jenis TLR dan ligannya.....	17
Tabel 2.2 Tipe Kanker dan Jenis TLR yang terekspresi	18
Tabel 2.3 Jenis flavonoid	29
Tabel 4.1 Pembagian Kelompok Perlakuan Imunositokimia.....	35
Tabel 5.1 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Kelor (<i>Moringa oleifera</i>).....	53
Tabel 5.2 Data MTT Assay.....	55
Tabel 5.3 Nilai rata-rata dan Standar error kelompok perlakuan	60
Tabel 5.4 Nilai rata-rata dan Standar error kelompok perlakuan.....	63



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Jalur ekspresi TLR4.....	19
Gambar 2.2 Efek ekspresi TLR4 pada kondisi kanker payudara.....	20
Gambar 2.3 Daun Kelor	25
Gambar 2.4. Struktur Flavonoid	27
Gambar 2.5. Struktur kimia jenis flavonoid.....	28
Gambar 3.1 Kerangka Konsep.....	30
Gambar 4.1 Alur Penelitian.....	52
Gambar 5.1 Kurva Hubungan Dosis dengan Jumlah Sel MCF-.....	57
Gambar 5.4 Hasil Penampakan Mikroskopik Ekspresi TLR4 Hasil Imunositokimia	58
Gambar 5.5 Penampakan Mikroskopik Sel MCF-7	59



DAFTAR LAMPIRAN

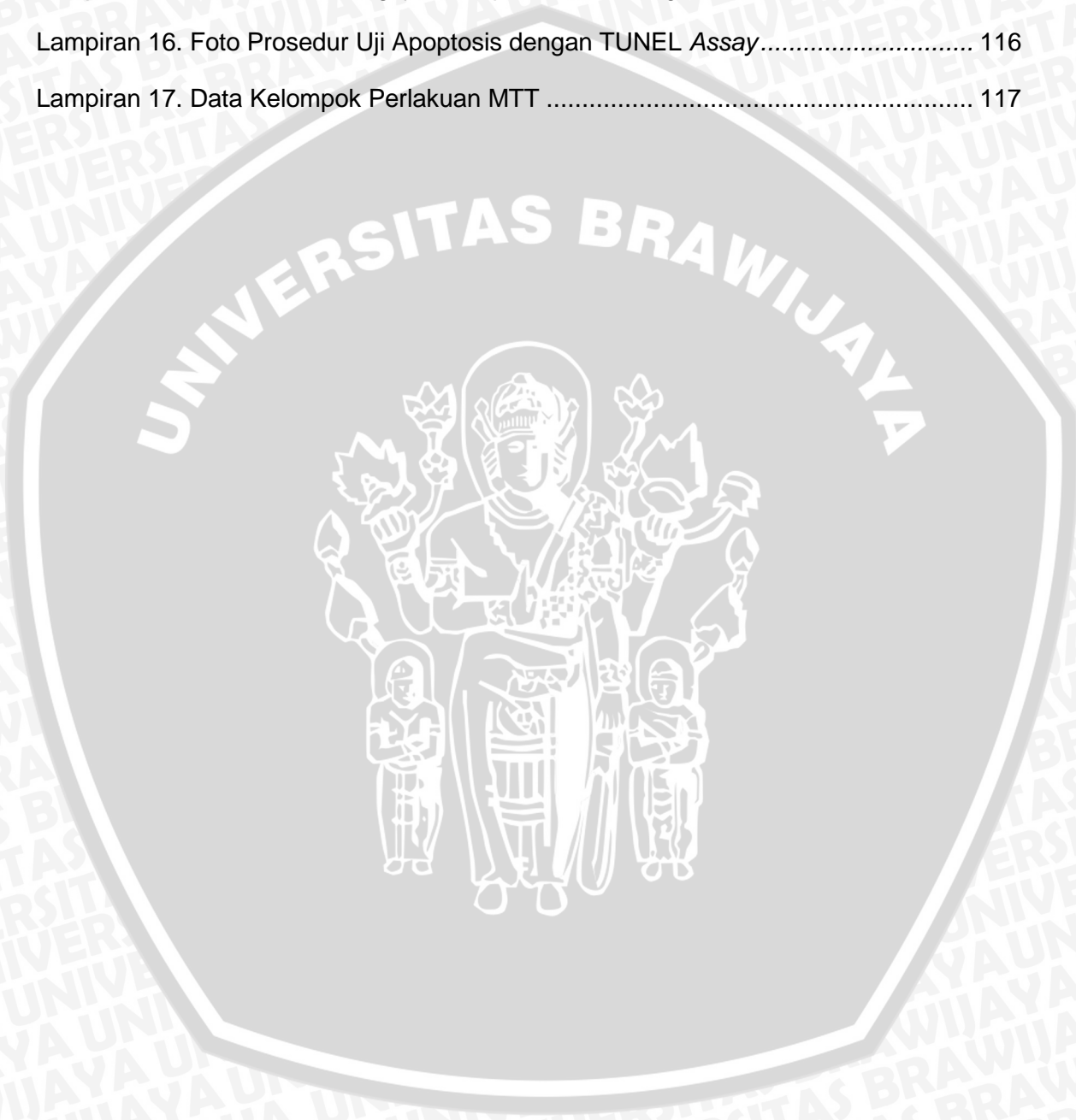
	Halaman
Lampiran 1. Pernyataan Keaslian tulisan	87
Lampiran 2. Keterangan kelayakan etik.....	88
Lampiran 3. Determinasi <i>Moringa oleifera</i>	89
Lampiran 4. Indeks Ekspresi TLR4	90
Lampiran 5. Indeks Apoptosis sel MCF-7	93
Lampiran 6. Data uji normalitas dan homogenitas Penentuan IC ₅₀ dengan MTT Assay	94
Data uji Spearman.....	94
Lampiran 7. Data uji normalitas dan homogenitas Penentuan ekspresi TLR4 dengan Imunositokimia	96
Uji Kruskal- Wallis	96
Uji Mann-Whitney.....	97
Uji Spearman.....	99
Lampiran 8. Data uji apoptosis dengan TUNEL Assay dan <i>One-way</i> ANOVA	101
Uji <i>Post hoc</i>	102
Uji Pearson	103
Lampiran 9. Hasil uji fitokimia ekstrak	105
Lampiran 10. Data perhitungan persen kematian MTT 1	108
Lampiran 11. Hasil foto Imunositokimia	109
Lampiran 12. Foto Prosedur Ekstraksi Daun Kelor	111
Lampiran 13. Foto Prosedur Kultur Sel	112

Lampiran 14. Foto sel dalam *well-plate* yang telah diberi MTT..... 113

Lampiran 15. Foto Proses Pengujian Ekspresi TLR4 dengan Imunositokimia 114

Lampiran 16. Foto Prosedur Uji Apoptosis dengan TUNEL Assay..... 116

Lampiran 17. Data Kelompok Perlakuan MTT 117

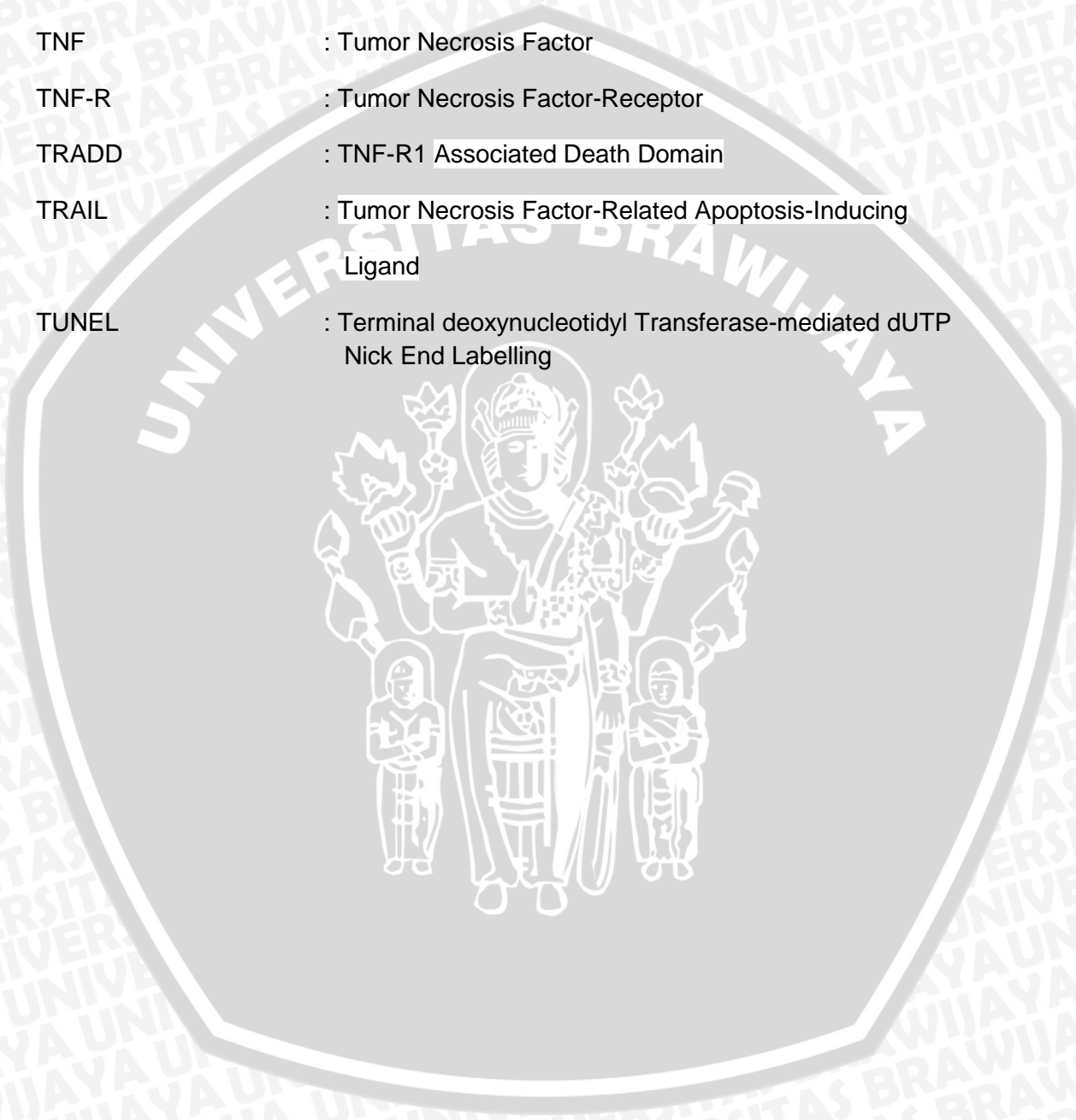


DAFTAR SINGKATAN

AIF	: Apoptosis Inducing Factor
Bax	: Bcl-2 associated x protein
Bak	: Bcl-2 associated killer
Bcl-2	: B Cell Lymphoma-2
Bcl-xl	: B Cell Lymphoma- xl
Bcl-w	: B Cell Lymphoma-w
Bid	: Bcl-2-interacting domain death agonist
BRCA1	: Breast Cancer Susceptibility Gene 1
BRCA2	: Breast Cancer Susceptibility Gene 2
Caspase-3	: Cysteine aspartic protease-9
COX2	: Cyclooxygenase-2
DCIS	: Ductus in situ
DFF	: DNA Fragmentation Factor
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide
DNA	: Deoxyribo Nucleic Acid
FADD	: Fas Associated Death Domain
FasL	: Fas Ligan
FBS	: Fetal Bovine Serum
HER	: Human Epidermal Growth Factor Receptor
HRT	: Hormon Replacement Therapy
IC ₅₀	: Inhibition Concentration 50

IFN	: Interferon
IκB	: Inhibitor Kappa Beta
IKK	: IκB Kinase
IL-1R	: Interleukin-1 Receptor
iNOS2	: Nitrit Oksida Sintase
KDa	: Kilo Dalton
LAF	: Laminar Air Flow
LPS	: Lipopolisakarida
MAL	: MyD88 Adaptor-like
MCF-7	: Michigan Cancer Foundation-7
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide
MyD88	: Myeloid Differentiation Factor 88
NF-κB	: Nuclear Factor Kappa Beta
NK cell	: Natural Killer cell
PAMP	: Pathogen Associated Molecular Pattern
PAR	: Poly(ADP-Ribose)
PARP-1	: PAR Polymerase-1
PBS	: Phosphate Buffer Saline
RNA	: Ribonucleic acid
ROS	: Reactive Oxygen Species
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute Medium
TAK1	: Transforming growth factor b Activated Kinase 1
TIR	: Toll/interleukin-1 receptor
TLR4	: Toll-like Receptor 4

- TRIF : TIR Domain-containing adaptor-Inducing IFN- β
- TRAM : TRIF-Related Adaptor Molecule
- TNF : Tumor Necrosis Factor
- TNF-R : Tumor Necrosis Factor-Receptor
- TRADD : TNF-R1 Associated Death Domain
- TRAIL : Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing
Ligand
- TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP
Nick End Labelling



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan kelompok penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan sel yang tidak terkontrol, invasi jaringan lokal, dan metastase. Kanker merupakan penyebab terbanyak kematian orang Amerika dengan usia kurang dari 85 tahun (Dipiro, 2008). Faktor pencetus kanker bisa berasal dari dalam (internal) seperti mutasi secara genetik, hormon, kondisi imun, dan mutasi akibat proses metabolime, serta dari luar (eksternal) yaitu rokok, senyawa kimia, radiasi, dan infeksi virus (American Cancer Society, 2012).

Kanker payudara adalah tumor ganas yang menyerang jaringan payudara. Sekitar 29% dari 232.340 wanita di Amerika mengalami kanker payudara dengan jumlah kematian sekitar 39,620. Diketahui bahwa sekitar 64.640 wanita mengalami kanker payudara in situ (belum bermestastase ke jaringan sekitar payudara) dan 61.300 melanoma in situ (belum bermestastase ke jaringan sekitar payudara) (American Cancer Society, 2012). Berdasarkan data *Pathology Based Cancer Registry* yang bekerja sama dengan yayasan kanker Indonesia, kanker payudara di Indonesia menduduki peringkat kedua dari semua kasus kanker yang terjadi (Luwia, 2009). Di Indonesia, kanker payudara menduduki peringkat kedua setelah kanker leher rahim diantara kanker yang menyerang wanita. Rata-rata penderita kanker payudara adalah 10 dari 100.000 perempuan (Nadhiroh, 2011).

Penggunaan obat kemoterapi sel kanker belum memberikan hasil yang optimal, karena obat anti kanker bekerja tidak hanya menyerang sel kanker,

namun juga dapat menyerang sel atau jaringan bukan kanker. Pengobatan untuk kanker payudara yang ada selama ini banyak menimbulkan efek samping. Misalkan saja doxorubicin, sebagai obat anti kanker juga dapat menyebabkan terjadinya kerontokan pada rambut. Insiden kanker payudara yang semakin meningkat setiap waktunya tidak diimbangi dengan adanya obat antikanker yang efektif (Kumala, *et al.*, 2010). Oleh karena itu, kecenderungan masyarakat untuk kembali ke alam (*back to nature*) dengan menggunakan obat herbal semakin tinggi. Berdasarkan *ethnomedicine*, kelor (*Moringa oleifera*) merupakan salah satu tanaman yang bagian daunnya memiliki aktivitas anti kanker (Balachandran dan Rajgopal, 2005).

Kelor (*Moringa oleifera*) merupakan tanaman tradisional yang berasal dari India Utara dan biasanya ditemukan di sepanjang daerah tropis. Kelor (*Moringa oleifera*) banyak dikonsumsi sebagai makanan karena kaya akan vitamin dan mineral serta telah diteliti memiliki kandungan-kandungan penting seperti antibiotik dan anti kanker (Saputra, 2012). Manguro and Lemmen (2007) mengatakan bahwa ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) mengandung 5 jenis flavonoid glikosida. Kandungan spesifik ekstrak daun kelor yang berperan sebagai anti kanker yaitu flavonoid glikosida 4-(α -L rhamnopyranosyloxy) benzylglucosinolate, 4-(α -L-rhamnopyranosyloxy) benzylisothiocyanate dan niazimicin. Quercetin-3-O-glukoside dan kaempferol-3-O-glikosida berperan sebagai antioksidan untuk melawan radikal bebas, dan thiocarbamates seperti niamicin adalah agen kemopreventif. Efek antitumor dari flavonoid dilaporkan dapat menginduksi penghambatan proliferasi sel dan menginduksi apoptosis pada berbagai sel kanker. Quercetin merupakan flavonoid bioaktif yang paling banyak terkandung dalam daun kelor diketahui dapat menghambat proliferasi sel

kanker (Saputra, 2012). Quersetin diketahui dapat menghambat signaling TLR4 sehingga menurunkan ekspresinya dan juga menghambat translokasi NF-kB ke inti sel (Bhaskar, 2011).

Toll-like receptors 4 (TLR4) diekspresikan pada sel-sel imun dan memiliki peranan penting dalam respon kekebalan tubuh terhadap penyakit. Aktivasi dari TLR4 menyebabkan peningkatan dari ekspresi TLR4 dan menginduksi produksi sitokin proinflamasi yang disebabkan karena adanya ROS yang berlebihan. Hal tersebut memicu IκB yang berikatan dengan NF-kB untuk memediasi proliferasi sel, respon inflamasi, dan faktor-faktor apoptosis (Hardyanto, dkk, 2012). Penurunan ekspresi TLR4 dan hambatan translokasi NF-kB ke inti sel akan menghambat pelepasan mediator inflamasi, sehingga akan menurunkan progresifitas kanker yang diakibatkan oleh adanya proses inflamasi (Bhaskar, 2011). Oleh karena itu, berdasarkan fakta diatas maka dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui peranan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) yang mengandung queretin terhadap penurunan ekspresi TLR4 dan apoptosis sel kanker payudara MCF-7.

1.2 Rumusan Masalah

- 1.2.1 Berapakah nilai *Inhibition Concentration 50* (IC50) ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap penurunan TLR4 pada sel kanker payudara MCF-7.
- 1.2.2 Apakah ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan ekspresi TLR4 pada sel MCF-7?
- 1.2.3 Apakah ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat meningkatkan apoptosis sel MCF-7?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan efek ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam menurunkan ekspresi TLR4 dan meningkatkan apoptosis sel MCF-7.

1.3.2 Tujuan khusus

- 1) Mengetahui nilai *Inhibition Concentration 50* (IC₅₀) ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap penurunan TLR4 pada sel kanker payudara MCF-7.
- 2) Menganalisis hubungan antara berbagai dosis ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan ekspresi TLR4.
- 3) Menganalisis hubungan antara berbagai dosis ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan apoptosis sel MCF-7.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

- 1) Bagi Ilmu Pengetahuan

Memberikan kontribusi dasar pemikiran tentang efek antikanker *in vitro* ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) sebagai alternatif terapi dalam mengatasi kanker payudara yang efektif di masa mendatang.

1.4.2. Manfaat Praktis

- 1) Bagi Masyarakat

Memberikan kontribusi gagasan bagi masyarakat tentang pemanfaatan daun kelor (*Moringa oleifera*) sebagai terapi antikanker.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker

2.1.1 Definisi

Sel tubuh secara normal akan tumbuh, kemudian membelah menjadi sel baru dan sel yang menua pada akhirnya akan mati. Pembelahan sel memiliki tingkat kecepatan yang berbeda sesuai dengan usia seseorang, dimana pada usia muda sel normal akan membelah dengan cepat seiring dengan pertumbuhannya. Sedangkan saat sudah dewasa, sel masih membelah, namun sel membelah hanya untuk menggantikan sel-sel yang mati ataupun untuk memperbaiki kerusakan sel. Kanker adalah kondisi kerusakan DNA yang mengakibatkan pertumbuhan sel berlebihan dimana sel yang seharusnya mati terus mengalami pertumbuhan menjadi sel baru yang abnormal dan bisa menyebar ke jaringan lain (American Cancer Association, 2013).

Kanker terjadi apabila sel tubuh tumbuh secara tidak normal dan tidak terkontrol. Pertumbuhan sel kanker tentunya berbeda dengan sel normal pada umumnya. Sel kanker tidak mati, bahkan tumbuh terus-menerus menjadi bentuk sel abnormal, dan bisa masuk ke jaringan-jaringan lain dimana kemampuan tersebut tidak dimiliki oleh sel normal. Kerusakan DNA termasuk sebagai penyebab terbentuknya sel kanker. Pada sel normal, DNA yang mengalami kerusakan akan diperbaiki atau sel akan mati, namun pada sel kanker, DNA yang rusak tidak diperbaiki tetapi sel tidak mati seperti seharusnya. Sel yang tidak mati tersebut akan membentuk sel-sel baru yang sebenarnya tidak dibutuhkan oleh tubuh. Pada beberapa kasus, sel kanker dapat terbentuk dari sel tumor, namun

tidak semua tumor dapat menyebabkan kanker (American Cancer Association, 2013).

2.2 Kanker Payudara

Kanker payudara adalah malignansi tumor yang bersifat kanker yang bermula dari sel pada payudara dan dapat bermetastase ke jaringan-jaringan disekitarnya (American Cancer Association, 2013). Kanker payudara paling banyak terjadi pada wanita, namun dapat terjadi juga pada pria.

2.2.1 Epidemiologi

American Cancer Society Facts and Figures (2013) menyebutkan bahwa kanker payudara merupakan penyakit dengan prevalensi kedua penyebab kematian pada wanita setelah kanker paru-paru. Diperkirakan pada tahun 2013 sekitar 232.340 kasus baru kanker payudara invasif, 64.640 kanker payudara in situ, dan sekitar 40.030 kematian akibat kanker payudara (39.620 wanita dan 410 pria) di Amerika.

2.2.2 Faktor risiko Kanker Payudara (American Breast Cancer, 2012)

1) Jenis kelamin

Wanita lebih berisiko mengalami kanker payudara terkait dengan kadar hormon estrogen dan progesteron yang lebih tinggi pada wanita dibandingkan pada pria.

2) Usia

Kanker payudara diketahui banyak terjadi pada wanita usia diatas 55 tahun

3) Genetik

Sekitar 5%-10% kasus kanker payudara terjadi karena mutasi gen turunan dari orangtua. Kebanyakan mutasi terjadi pada gen BRCA1 dan BRCA2 yang berperan dalam proteksi sel agar tumbuh secara normal.

4) Riwayat keluarga kanker payudara

Wanita yang memiliki hubungan pertama (*first-degree relative*) seperti ibu, saudara perempuan, atau anak perempuan dengan penderita kanker payudara akan memiliki risiko tinggi terkena kanker payudara.

5) Riwayat menderita kanker payudara

Wanita yang sebelumnya pernah menderita kanker payudara, memiliki 3-4 kali risiko lebih tinggi terkena kanker di bagian lain pada payudara yang sama maupun pada payudara yang berbeda.

6) Ras dan etnik

Wanita dengan ras kulit putih memiliki risiko yang lebih tinggi terkena kanker payudara dibandingkan wanita ras kulit hitam

7) Periode Menstruasi

Wanita yang mengalami menstruasi dini (sebelum usia 12 tahun) dan menopause yang lambat (diatas 55 tahun) memiliki risiko kanker payudara yang tinggi. Hal tersebut dikarenakan waktu paparan hormon estrogen dan progesterone yang lebih lama.

8) Radiasi

Wanita (dewasa dan remaja) yang pernah melakukan terapi radiasi pada daerah dada untuk jenis kanker lain seperti Hodgkin /

non-Hodgkin limfoma, memiliki risiko yang tinggi mengalami kanker payudara.

9) Melahirkan dan menyusui

Wanita yang tidak memiliki anak atau memiliki anak pada usia diatas 30 tahun memiliki risiko tinggi kanker payudara. menyusui berhubungan dengan siklus hormonal terkait dengan hormone estrogen dan progesterone. Kadar hormone estrogen dan progesterone akan rendah selama masa menyusui sehingga akan mengurangi proliferasi jaringan payudara yang disebabkan oleh kedua hormone tersebut (Setiawan *et al.*, 2009)

10) Kontrasepsi oral dan *Hormon Replacement Therapy (HRT)*

Berdasarkan studi, disebutkan wanita yang menggunakan kontrasepsi oral dan *HRT post-menopause* memiliki risiko tinggi kanker payudara. Kandungan estrogen dan progesterone pada oral kontrasepsi akan menimbulkan efek proliferasi berlebih pada epitel duktus payudara sehingga sel-sel abnormal akan berproliferasi secara terus-menerus dan tidak dapat dikendalikan yang berakibat terjadinya kanker (Setiawan *et al.*, 2009).

11) Aktifitas fisik

Berdasarkan studi dari *Women's Health Initiative*, melakukan olahraga ringan 1,25-2,5 jam dan berjalan santai 10 jam setiap minggu dapat menurunkan risiko wanita terkena kanker payudara.

12) Paparan zat kimia

Paparan zat kimia mengandung estrogen ataupun yang menyerupai estrogen dalam jangka waktu yang lama dapat

meningkatkan risiko kanker payudara. Contohnya yaitu organoklorin pestisida seperti DDT, merupakan estrogen lemah yang mengandung komponen-komponen lipofilik dan dapat disimpan di jaringan adipose. Beberapa studi menjelaskan adanya paparan dari senyawa kimia ini dapat meningkatkan risiko besar terjadinya kanker payudara (Setiawan *et al.*, 2009).

13) Pola konsumsi makanan berlemak

Beberapa studi menunjukkan bahwa pola diet makanan berlemak yang tinggi dapat meningkatkan risiko terkena kanker payudara. Diet tinggi lemak akan meningkatkan produksi estrogen karena meningkatnya pembentukan jaringan adipose (Setiawan *et al.*, 2009).

14) Kebiasaan mengonsumsi Makanan Berserat

Diet makanan berserat berhubungan dengan rendahnya kadar sebagian besar aktivitas hormon seksual dalam plasma, tingginya kadar *sex hormone-binding globulin (SHBG)*, serta akan berpengaruh terhadap mekanisme kerja penurunan hormon estradiol dan testosteron akan berakibat pada menurunnya kecepatan proses proliferasi yang dapat mencegah terjadinya kanker payudara (Setiawan *et al.*, 2009).

15) Obesitas

Ada peningkatan risiko terkena kanker payudara pada wanita dengan *Body Mass Index* yang besar. Risiko pada kegemukan akan meningkat karena meningkatnya sintesis estrogen pada timbunan lemak yang berpengaruh terhadap proses proliferasi jaringan payudara (Setiawan *et al.*, 2009).

- 16) Merokok
- 17) Konsumsi alkohol

2.2.3 Patofisiologi

Sel kanker dibentuk dari sel normal melalui proses yang rumit yaitu transformasi. Proses ini terdiri atas tahap inisiasi dan promosi. Pada tahap inisiasi, terjadi perubahan bahan genetik sel yang disebabkan oleh agen karsinogen berupa zat kimia, virus, radiasi, maupun sinar matahari. Pada tahap promosi, sel telah mengalami inisiasi dan akan berubah menjadi ganas. Sel yang belum melewati tahap inisiasi tidak akan terpengaruh oleh tahap promosi (Desen, 2008). Karsinogenesis melibatkan tiga tahap dalam regulasinya yaitu tahap inisiasi, promosi, dan progresi. Tahap inisiasi merupakan tahap yang diawali oleh adanya paparan substansi bersifat karsinogen terhadap sel normal. Paparan karsinogen tersebut apabila tidak diperbaiki akan menimbulkan kerusakan genetik dan menyebabkan mutasi seluler yang bersifat irreversibel. Mutasi sel tersebut akan mengalami perubahan respon terhadap lingkungan. Tahap selanjutnya yaitu tahap promosi. Pada tahap ini, substansi karsinogen mengubah lingkungan sehingga akan mendukung pertumbuhan dan perkembangan sel yang mengalami mutasi untuk menjadi sel kanker. Pada tahap akhir yaitu progresi, akan terjadi mutasi genetik yang lebih kompleks sehingga akan memicu meningkatnya proliferasi sel (Dipiro *et al.*, 2008).

Pada karsinogenesis ada dua gen utama yang terlibat yaitu onkogen dan supresor tumor. Onkogen dan supresor tumor memiliki fungsi yang berbeda. Onkogen yang teraktivasi akan memediasi pertumbuhan sel kanker, sedangkan supresor tumor akan menghambat pertumbuhan dari sel kanker. Protoonkogen

merupakan regulator sel normal yang terdapat pada semua sel. Radiasi, zat kimia, atau virus merupakan karsinogen yang dapat merubah genetik protoonkogen, sehingga mutasi protoonkogen tersebut akan menyebabkan aktivasi dari onkogen, dimana onkogen merupakan gen yang bersal dari sel normal. Saat teraktivasi, onkogen akan diekspresikan secara berlebihan. Contoh dari onkogen yaitu famili dari *human epidermal growth factor receptor* (HER). Aktivasi dari reseptor tersebut akan memediasi peningkatan proiferasi sel dan diferensiasi dengan mengaktivasi reseptor tirosin kinase intraseluler. Ekspresi yang berlebihan dari onkogen juga akan menyebabkan metastasis dan angiogenesis pada kanker. Gen supressor tumor secara normal akan menghambat pertumbuhan dari sel kanker, namun mutasi yang terjadi akan menyebabkan kontrol pertumbuhan sel normal akan hilang sehingga terjadi proliferasi sel yang abnormal (Dipiro *et al.*, 2008).

Pada kanker payudara, terjadi proliferasi keganasan sel epitel yang membatasi duktus atau lobus payudara. Pada tahap awal, terjadi hiperplasia sel yaitu adanya penambahan epitel pada intraduktus. Kemudian hiperplasia disertai dengan perkembangan sel-sel atipikal yang selanjutnya akan menjadi karsinoma *in situ* dan menginvasi stroma. Karsinoma *in situ* ini bisa berkembang menjadi tahap kanker, namun tidak dalam waktu yang singkat. Kanker membutuhkan waktu yang lama, kurang lebih 7 tahun untuk tumbuh dari satu sel menjadi massa yang cukup besar untuk dipalpasi. Kanker payudara sudah mengalami metastasis sekitar 25% apabila massa sel sudah berukuran kira-kira 1 cm (Price and Wilson, 2006).

2.2.4 Klasifikasi kanker payudara

Kanker payudara dibagi menjadi beberapa jenis yaitu karsinoma duktus in situ, karsinoma lobular in situ, karsinoma duktus invasif, dan karsinoma lobular invasif. Karsinoma duktus in situ merupakan pre-kanker ditandai dengan adanya perubahan lapisan sel duktus yang menyerupai sel kanker, namun sel tidak dapat menyebar ke jaringan payudara lain. Karsinoma lobular in situ merupakan kanker yang terjadi pada lobulus payudara. Karsinoma duktus invasif merupakan tipe kanker payudara yang sering terjadi, dimana tipe ini muncul pada saluran (duktus) susu, merusak dinding duktus, kemudian menyebar ke sistem limfa dan sistemik. Sedangkan karsinoma lobular invasif muncul pada kelenjar penghasil susu (lobulus). Karsinoma tipe ini lebih susah di deteksi dengan mamografi dibandingkan karsinoma duktus invasif dan dapat bermetastase ke bagian lain pada tubuh (American Breast Cancer Association, 2012).

2.2.5 Tanda dan Gejala Kanker Payudara (Depkes RI, 2006)

- a. Terdapat benjolan pada payudara.

Benjolan ini umumnya tidak nyeri. Benjolan awalnya kecil namun makin lama makin besar, kemudian melekat pada kulit dan menimbulkan perubahan pada kulit payudara atau puting susu.

- b. Erosi atau eksema puting susu.

Kulit atau puting susu menjadi tertarik ke dalam, bewarna merah muda atau kecoklat-coklatan hingga akhirnya membengkak (edema), permukaan kulit mengkerut seperti kulit jeruk atau timbul ulkus pada payudara. Ulkus akan membesar dan mendalam sehingga dapat merusak payudara, terkadang berbau busuk dan mudah berdarah.

- c. Perdarahan pada puting susu
- d. Timbul rasa nyeri pada payudara , namun baru terasa saat tumor sudah membesar dan bermetastasis.
- e. Terjadi pembesaran kelenjar getah bening di ketiak, pembengkakan pada lengan, dan penyebaran kanker di seluruh tubuh.

2.2.6 Stadium Kanker Payudara (American Breast Cancer Society, 2012)

a. Stadium 0

Merupakan tahap awal kanker payudara yaitu karsinoma duktus in situ (DCIS). Pada stage ini sel kanker masih berada di dalam jaringan payudara yang normal dan belum masuk terlalu dalam pada jaringan lemak payudara.

b. Stadium IA

Tumor dengan diameter 2 cm dan belum menyebar ke nodus limfa atau jaringan-jaringan yang berjauhan (keluar dari payudara)

c. Stadium IB

Tumor dengan diameter 2 cm dengan mikrometastase di 1-3 bagian axilla nodus limfa, namun belum menyebar di jaringan yang berjauhan (keluar dari payudara)

d. Stadium IIA

Tumor dengan diameter berukuran 2 cm tetapi sudah menyebar ke kelenjar getah bening ketiak atau tumor dengan ukuran diameter 2-5 cm ,namun belum menyebar ke kelenjar getah bening ketiak.

e. Stadium IIB

Tumor dengan diameter 2-5 cm dan menyebar ke kelenjar getah bening ketiak, namun belum menyebar ke jaringan yang berjauhan atau tumor berdiameter >5 cm dan belum menyebar ke kelenjar getah bening di ketiak.

f. Stadium IIIA

Tumor dengan diameter <5 cm dan sudah menyebar ke kelenjar getah bening ketiak dan disertai dengan perlekatan antara satu dengan yang lain atau dengan struktur lainnya, atau tumor dengan diameter >5cm dan sudah menyebar ke kelenjar getah bening di ketiak.

g. Stadium IIIB

Tumor telah tumbuh keluar dari payudara, yaitu ke dalam kulit payudara atau ke dalam dinding dada atau telah menyebar ke kelenjar getah bening di dalam dinding serta tulang dada. Pada stadium ini sudah terjadi inflamasi.

h. Stadium IIIC

Tumor tidak bisa ditentukan ukurannya (tidak bisa ditemukan), sudah menyebar ke nodus limfa pada atas dan bawah tulang dada, serta semakin membesar di nodus limfa di dalam payudara.

i. Stadium IV

Kanker tidak dapat ditentukan ukurannya, kemungkinan besar telah menyebar keluar payudara semakin mendekati nodus limfa. Kanker telah menyebar ke organ lain yang berjauhan atau ke nodus

limfa yang jauh dari payudara. Biasanya kanker menyebar pada tulang, hati, otak, dan paru-paru.

2.2.7 Cell line MCF-7

Sel *Michigan Cancer Foundation-7* atau MCF-7 merupakan sel kanker payudara yang pertama kali diperoleh dari *pleural effusion breast adenocarcinoma* pasien wanita Kaukasian berumur 69 tahun, golongan darah O, dengan Rh positif. Sel menunjukkan adanya diferensiasi pada jaringan epitel mammae termasuk diferensiasi pada sintesis estradiol. Sel MCF-7 berbeda dengan sel T47D. Sel MCF-7 tumbuh secara monolayer menyerupai sel epitel, dan memiliki karakteristik yang berbeda pada epitel payudara diantaranya yaitu kemampuannya untuk membentuk *dome*. Sel ini paling sering digunakan dalam penelitian secara in-vitro karena memiliki bentuk yang terbaik dari semua jenis sel kanker payudara manusia. Sel MCF-7 tergolong dalam jenis *cell line adherent* yang akan tumbuh melekat dimana sel tersebut mengekspresikan reseptor estrogen (ER+) , ekspresi berlebih Bcl-2, tidak mengekspresikan caspase-3 (Prunet,dkk, 2005), serta resisten terhadap agen kemoterapi seperti doxorubicin (Zampieri,dkk, 2002). Sel MCF-7 dapat ditumbuhkan menggunakan media yang mengandung RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) , FBS (Fetal Bovine Serum), dan DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Widowati, 2009).

2.3 Toll-like receptor 4 (TLR 4)

Pada manusia, sistem imun dibedakan menjadi dua yaitu sistem imun alamiah (innate) dan sistem imun bawaan (adaptif).

Patogen dideteksi dan dieliminasi oleh sistem imun dengan membedakan antara *self* dan *non-self*. Sistem imun adaptif akan mengenali *non-self* melalui pengenalan antigen peptida menggunakan reseptor antigen yang terekspresi pada permukaan sel T dan B. Sistem imun alamiah contohnya seperti *Toll-like receptor (TLR)* mengenali pola spesifik komponen mikroba terutama dari patogen dan meregulasi tidak hanya sistem imun alamiah tetapi juga sistem imun adaptif (Takeda *et al.*, 2003).

Toll merupakan protein transmembran tipe 1 yang pertama kali diidentifikasi sebagai pengatur bentuk dorsoventral selama proses embriogenesis serangga *Drosophila* dan respon imun terhadap mikroorganisme pada *Drosophila* dewasa. Hasil kloning analog *Toll* dari mamalia saat ini dikenal dengan kelompok *Toll-like receptors (TLR)* (Medvedev *et al.*, 2000). TLR merupakan protein transmembran dengan domain sinyal intraseluler yang homolog dengan interleukin-1 reseptor (IL-1R) dan domain ekstraseluler spesifik yang kaya akan leusin (Wang *et al.*, 2010). Pada proses signaling intraseluler, TLR yang teraktivasi oleh ligan akan menyebabkan domain TIR pada TLR melekat erat, sehingga domain TIR mampu berinteraksi dengan protein adaptor hingga terjadi signaling intraseluler. Protein adaptor TLR ada 4 macam, yaitu: Myeloid Differentiation Factor 88 (MyD88), MyD88 adaptor-Like (MAL), TIR Domain-Containing Adaptor- Inducing IFN- β (TRIF), dan TRIF- Related Adaptor Molecule (TRAM) (Murphy, 2012). Saat ini telah ada 13 jenis TLR yaitu TLR1-TLR13. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10, TLR11, dan TLR12 terekspresi secara luas pada permukaan sel untuk mengenali molekul yang dihasilkan oleh mikroba. Sedangkan TLR3, TLR7, TLR8, dan TLR9 merupakan kelompok TLR intraseluler dan secara intrinsik mampu

mendeteksi asam nukleat (Blasius, 2010). Dari 113 jenis TLR tersebut, hanya ada 11 jenis yang ada pada manusia yaitu TLR1-TLR11 (Sato *et al.*, 2009).

Tabel 2.1 Jenis TLR dan ligannya (Sato *et al.*, 2009)

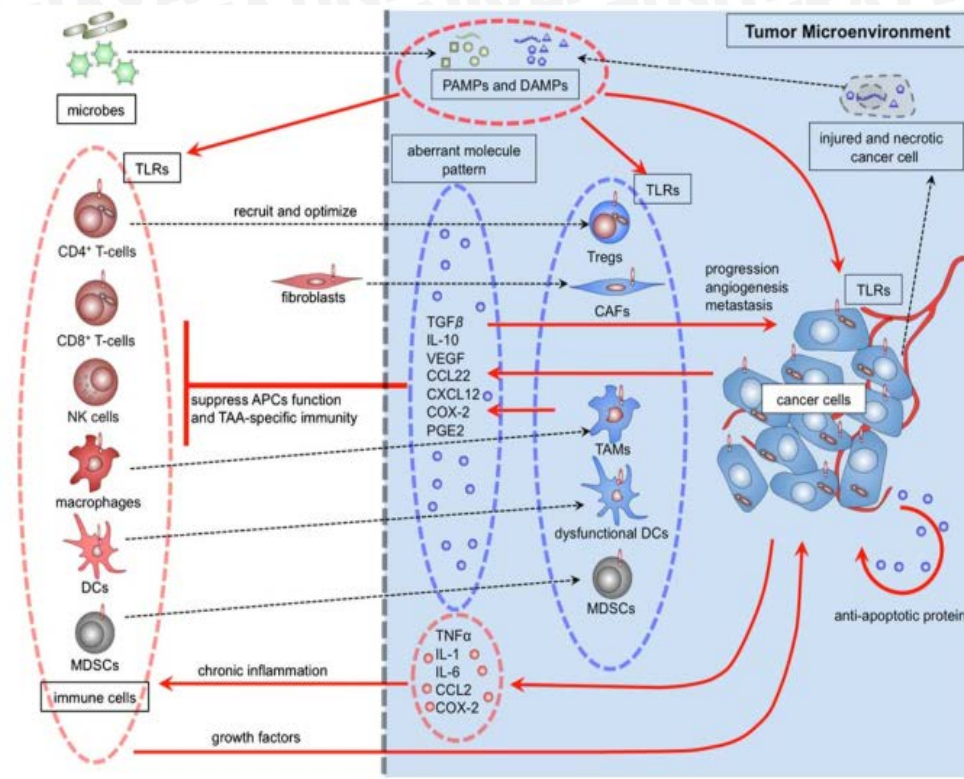
Jenis	Ligan DAMP	PAMP
TLR1	-	Triacyl lipoprotein
TLR2	Heat shock protein HMGB1	Peptidoglikan Lipoprotein Asam Lipoteichoic Zymosan
TLR3	self dsRNA	Virus dsRNA
TLR4	Heat shock protein Fibrinogen Asam hialuronik	Heat shock protein Lipopolisakarida Paclitaxel
TLR5	-	Flagellin
TLR6	-	Asam Lipoteichoic Triacyl lipoprotein
TLR7	self ssRNA	Virus ssRNA
TLR8	self ssRNA	Virus ssRNA
TLR9	self DNA	Bakteri / virus DNA
TLR10	-	-
TLR11	-	Profiling

Sinyalisasi TLR akan menimbulkan respon inflamasi yaitu respon tubuh untuk mempertahankan kondisi agar tetap normal saat ada senyawa patogen yang masuk, ataupun akibat kerusakan jaringan oleh kanker. Inflamasi akibat aktivasi TLR pada sel kanker tersebut akan meningkatkan progresifitas kanker,

aktivitas anti-apoptosis dan resistensi respon imun tubuh (Sato *et al.*, 2009). Selain itu, stimulasi TLR dapat menyebabkan kerusakan dan mutasi dari genom DNA dan translokasi kromosom yang abnormal (Wang *et al.*, 2010). Dalam menghasilkan respon inflamasi, TLR umumnya bergantung pada protein adaptor yaitu MyD88 (jalur MyD88-dependent). Sinyal TLR4/MyD88 diketahui berperan dalam pertumbuhan tumor pada beberapa organ. TLR4 maupun jenis TLR lain terdeteksi diantaranya pada *cell line* kanker laring, paru-paru, gastrik, kolon, prostat, melanoma, dan payudara. Jalur MyD88-dependent biasa terjadi pada semua jenis TLR, sedangkan jalur MyD88-independent secara khusus terjadi pada TLR3 dan TLR4. Proses signaling melalui MyD88 melibatkan aktivasi awal dari *Nuclear Factor- κ B* (NF- κ B) dimana akan memicu produksi sitokin proinflamasi. Sedangkan terbentuknya signal jalur TLR dengan MyD88-independent yang akan melibatkan aktivasi fase lambat NF- κ B dan aktivasi IFN faktor regulasi 3 sehingga memicu produksi IFN tipe 1 (IFN α/β), dan regulator respon imun. Aktivasi sinyal TLR4 juga diketahui dapat menghambat apoptosis sel tumor, sehingga hambatan pada aktivasi sinyal TLR4 pada sel kanker dapat mengurangi pertumbuhan dari tumor (Wang *et al.*, 2010).

Tabel 2.2 Tipe Kanker dan Jenis TLR yang terekspresi (Sato *et al.*, 2009).

Tipe Kanker	Jenis TLR
Kanker Lambung	TLR2, TLR4, TLR5, TLR9
Kanker Kolon	TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR9
Kanker Serviks	TLR3, TLR4, TLR5, TLR9
Kanker Payudara	TLR2, TLR3, TLR4, TLR9
Kanker Prostat	TLR4, TLR9
Kanker Ovarium	TLR2, TLR3, TLR4, TLR5



Gambar 2.1 Jalur ekspresi TLR4 (Sato *et al.*, 2009).

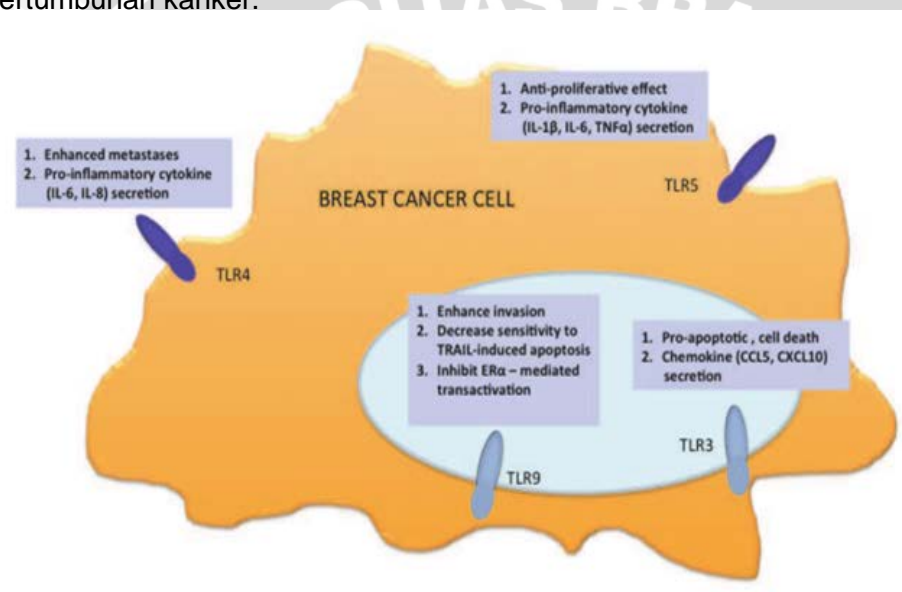
Keterangan: Signaling TLR4 berkontribusi terhadap progresifitas tumor, dimana PAMP dan DAMP (kerusakan sel dan nekrosis sel kanker) menyebabkan aktivasi ekspresi TLR4 pada sel imun dan sel kanker. Ekspresi TLR4 akan mengakibatkan pelepasan sitokin dan kemokin, sehingga memperparah kondisi sel dan menghambat proses apoptosis sel kanker.

2.4 Hubungan TLR4 dan Kanker Payudara

Upregulasi jalur protumorigenik yaitu dengan induksi dari Nitrit oksida sintase (iNOS2) dan COX2 dapat meningkatkan ekspresi dari TLR4 dan progresifitas tumor (Ridnour, dkk, 2012). Menurut penelitian, ekspresi TLR4

berperan dalam pertumbuhan sel tumor yaitu pada proses karsinogenesis dan progresifitas tumor selama inflamasi kronik. Ligasi dari ekspresi TLR4 pada sel tumor dapat menginduksi inflamasi kronik yang akan meningkatkan

pertumbuhan dari sel tumor itu sendiri (Sato *et al.*, 2009). Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Szczepanski (2014), TLR4 mampu meningkatkan pertumbuhan tumor dengan menginduksi proliferasi sel, aktivasi NF- κ B subunit p65, dan resistensi NK sel. Ekspresi TLR4 diketahui meningkatkan progresifitas dari kanker kolon melalui evasi sistem imun dengan menghambat NK sel dan aktivitas efektor sel T sehingga akan memediasi pertumbuhan kanker.



Gambar 2.2 Efek ekspresi TLR4 pada kondisi kanker payudara

Mekanisme TLR4 dalam meregulasi terjadinya tumor ada berbagai macam yaitu TLR4 secara langsung dapat meregulasi pertumbuhan dengan memodulasi jalur signaling proliferasi dan survival. TLR4 diekspresikan pada berbagai tipe sel tumor dan dapat mengaktivasi signaling downstream terhadap stimulasi. TLR4 mengenali *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP), salah satunya yaitu Hsp70 dan menginisiasi respon imun. Kerusakan sel pada kondisi kanker, menyebabkan rilisnya protein Hsp70. Hsp70 tersebut diketahui menginduksi jalur

TLR4 dengan menginduksi sitokin proinflamasi (TNF- α , IL-1, IL-6), dan merilis nitrit oksida (radikal bebas) (Huang *et al.*, 2008). Kelly *et al.*, (2006) pada penelitiannya menggunakan sel kanker ovarium, mengatakan bahwa ada keterkaitan antara ekspresi TLR4 dengan protein adaptornya yaitu MyD88 dalam merespon karsinogen. Adanya MyD88, karsinogen dapat menginduksi lokalisasi NF-kB pada inti sel kemudian akan terjadi peningkatan proliferasi sel, serta produksi sitokin proinflamasi seperti TNF- α . Sebaliknya, tidak adanya MyD88, mengakibatkan karsinogen gagal menginduksi translokasi NF-kB ke inti sel dan tidak terjadi peningkatan proliferasi sel serta produksi sitokin atau kemokin. NF-kB meregulasi ekspresi gen yang terlibat dalam proses proliferasi, diferensiasi sel, apoptosis, inflamasi, respon oksidatif, dan respon imun. Pada keadaan inaktif, NF-kB berada di sitoplasma dan berikatan dengan I κ B (inhibitor kappa beta). Ikatan antara NF-kB dengan I κ B akan terlepas apabila ada stimulasi dari luar, seperti ROS, NF-kB akan menuju nukleus, berikatan dengan sel target dan menginduksi sitokin proinflamasi. Peningkatan sitokin proinflamasi akan menginduksi apoptosis atau nekrosis sel (Indarto, 2013).

Mekanisme lain yaitu stimulasi TLR4 dapat meningkatkan regulasi ekspresi protoonkogen sehingga mendorong tumorigenesis. Berdasarkan penelitian, penurunan ekspresi TLR4 diketahui dapat melindungi hewan coba tikus dari tumorigenesis (Fukata *et al.*, 2007).

2.5 Apoptosis

Pertumbuhan tumor dapat terjadi karena aktivitas proliferasi yang tak terkontrol dan menurunnya aktivitas apoptosis. Apoptosis merupakan kematian sel terprogram yang diperlukan dalam keseimbangan homeostasis tubuh (Adityo,

2008). Apoptosis secara genetik diregulasi pembentukannya oleh sel yang mati dan berperan penting untuk menghilangkan infeksi, kerusakan, dan sel yang tidak diperlukan dari dalam tubuh. Hilangnya proses apoptosis pada sel, berkontribusi besar dalam terjadinya kanker. Apoptosis dipicu oleh berbagai stimulus ekstraseluler dan intraseluler dan akan menyebabkan aktivasi berhubungan dengan famili dari sistein protease yang disebut *caspase*. (Devarajan *et al.*, 2002). Proses apoptosis tidak menimbulkan respon biologis, sel yang mati akan tetap berada dalam membran selama terdegradasi dan kemudian akan difagositosis oleh makrofag sebelum isi sel bocor mengenai sel tetangganya. Diperkirakan terdapat 50-70 milyar sel mati setiap harinya karena apoptosis pada manusia dewasa (Adityo, 2008).

Apoptosis terjadi melalui 2 jalur yaitu jalur intrinsik dan jalur ekstrinsik (reseptor kematian) yang melibatkan beberapa jenis protein (Rastogi *et al.*, 2009). Jalur intrinsik inisiasi faktor sinyal berasal dari mitokondria dalam sel, sedangkan jalur ekstrinsik diinisiasi melalui stimulasi dari reseptor kematian. Proses apoptosis pada jalur ekstrinsik dimuli dengan pelepasan ligan oleh sel lain. Proses apoptosis jalur intrinsik bisa disebabkan oleh senyawa kimia atau hilangnya faktor pertumbuhan yang mengakibatkan mitokondria terganggu dan terjadi pelepasan sitokrom c dari intermembran mitokondria (Adityo, 2008). Protein apoptosis pada mitokondria (family Bcl-2) berdasarkan perannya yaitu ada yang berperan sebagai proapoptosis terdiri dari Bax, Bak, dan Bok/Mtd, sedangkan sebagai antiapoptosis yaitu Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, dan A1/Bfl-1. Aktivasi dari Bax akibat regulasi berkaitan dengan translokasi Bax dari sitosol ke membran luar mitokondria dan mengalami oligomerisasi. Sebaliknya, translokasi Bak ke membran luar mtokondria melalui daerah transmembran c-terminal

(Martinou, 2011). Pada jalur ekstrinsik apoptosis, melibatkan trimerisasi reseptor kematian seperti Fas dan TRAIL, sehingga akan mengaktifasi procaspase-8. Setelah diaktifkan, caspase-8 memotong *downstream effector* seperti caspase-3 dan menyebabkan translokasi Bid ke dalam mitokondria untuk dapat terhubung dengan jalur kematian intrinsik dan terjadi pelepasan protein apoptogenik seperti sitokrom c dan *apoptosis inducing factor* (AIF). Kematian sel terprogram diinisiasi oleh aktivasi reseptor kematian sel dan berhubungan dengan aktivasi caspase sistein protease, dimana akan menyebabkan terjadinya apoptosis (Rieckher, 2010). Caspase-3 berperan dalam fragmentasi DNA serta membran *blebbing* pada proses apoptosis. Fragmentasi DNA terjadi melalui hambatan pada protein DFF45, sehingga terjadi pembelahan DNA. Protein DFF45 yaitu protein yang menghambat fragmentasi DNA pada tahap akhir apoptosis dengan membentuk dimer dengan DFF40 didalam nucleus. Pada sel kanker payudara MCF-7, terjadi delesi 47 pasang basa DNA termasuk ekson-3 pada gen *CASP-3* sehingga pada sel kanker ini tidak terekspresi adanya caspase-3. Hal tersebut menyebabkan ekson-3 melewati pre-mRNA *splicing*, dan kemudian menghambat translasi mRNA *CASP-3* (Mooney, 2002 ; Liang, 2001).

Caspase-3 memiliki hubungan erat dengan caspase-7, dimana berdasarkan penelitian *in vitro*, keduanya memiliki substrat sintetik spesifik yang sama. Berdasarkan penelitian yang membandingkan MCF-7 dengan sel kanker payudara lain yaitu T47D yang diinduksi dengan Staurosporine (STS), disebutkan bahwa apoptosis dapat dideteksi dengan mengamati karakteristik dari sel MCF-7 dan T47D yaitu memiliki nukleus yang kecil dan hasil kondensasi kromatin membentuk bulan sabit disekililing nukleus. Pada pengamatan ekspresi caspase-7, diketahui pada sel MCF-7 tidak terekspresi caspase-7, mungkin ini

dikarenakan ketiadaan caspase-3 pada sel MCF-7. Pada sel T47D terdeteksi adanya aktivitas DEVDase yang menyebabkan pembelahan DFF45 dan terjadi fragmentasi DNA, namun tidak pada MCF-7. Aktivitas DEVDase tidak terdeteksi pada sel MCF-7 dalam menanggapi STS menunjukkan bahwa caspase-7 tidak terlibat dalam proses apoptosis pada sel MCF-7. Namun, ditemukan bahwa caspase-6 teraktivasi pada sel MCF-7. Beberapa studi mengatakan bahwa pada kondisi ketiadaan caspase-3 seperti pada sel MCF-7, tidak terjadi DNA fragmentasi dan terjadi rilis sitokrom c yang sangat lambat dibandingkan pada sel yang mengekspresikan caspase-3. Namun dengan ketiadaan caspase-3, sel timosit menunjukkan ada fragmentasi DNA dengan kinetika yang lambat, kemudian menginduksi aktivasi caspase-6. Caspase-6 diketahui bertanggungjawab atas proses pembelahan lamina nukleus yang berfungsi untuk menjaga integritas nukleus dan sel yang akan mengalami pembelahan disebabkan oleh caspase sehingga nantinya akan terjadi fragmentasi DNA pada apoptosis sel (Mooney, 2002 ; Blank, 2007). Menurut Liang (2001), caspase-9 tidak hanya mengaktivasi caspase-3, namun juga caspase-7. Berdasarkan penelitian pada sel MCF-7 yang diberikan terapi antineoplastic neocarzinostatin, pengamatan terhadap aktivasi dari caspase-9,-7, dan -6, dihasilkan bahwa masing-masing caspase-9 memerlukan waktu ± 15 menit, caspase-7 memerlukan waktu ± 1 jam, dan caspase-6 memerlukan waktu ± 2 jam. Dengan demikian, pada sel MCF-7, caspase-9 secara otomatis mengaktivasi caspase-7, dan kemudian mengaktivasi caspase-6 sehingga terjadi apoptosis.

Secara morfologi, apoptosis dikarakterisasikan dengan adanya fragmentasi DNA, kondensasi sitoplasma, piknosis inti sel, kondensasi kromatin, pembentukan sel menjadi bulat, terjadi koleps pada sitoskeletal, dan

pembentukan badan-badan apoptosis yang berikatan dengan membran sehingga akan di fagositosis dan dimakan oleh makrofag tanpa mengaktivasi respon imun (Li, 2008).

2.6 Kelor (*Moringa oleifera*)

2.6.1 Taksonomi (Mustafa, 2003)

Divisi	: Spermatofit
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dikotil
Ordo	: Brassica
Famili	: Moringaceae
Genus	: Moringa
Spesies	: <i>Moringa oleifera</i> Lamk

2.6.2 Daun kelor (*Moringa oleifera*)



Gambar 2.3 Daun Kelor (Jonny et al., 2008)

Daun kelor (*Moringa oleifera*) termasuk dalam famili *Moringaceae*, merupakan tanaman yang berasal dari India dan banyak sekali ditemukan di Afrika Selatan. Daun kelor (*Moringa oleifera*) disebut juga *drumstick tree* karena seluruh bagian tanaman dapat digunakan. Tanaman ini banyak dibudidayakan untuk tujuan industri maupun pengobatan, dimana seluruh bagian tanaman dapat digunakan sebagai obat sedangkan daunnya memiliki kandungan nutrisi yang tinggi seperti vitamin C, A, kalium, protein, kalsium, dan besi. Pada daun juga terdapat karoten, alkaloid, flavanoid, dan asam amino seperti sistin, lisin, metionin, dan triptofan (Tiloke *et al.*, 2013).

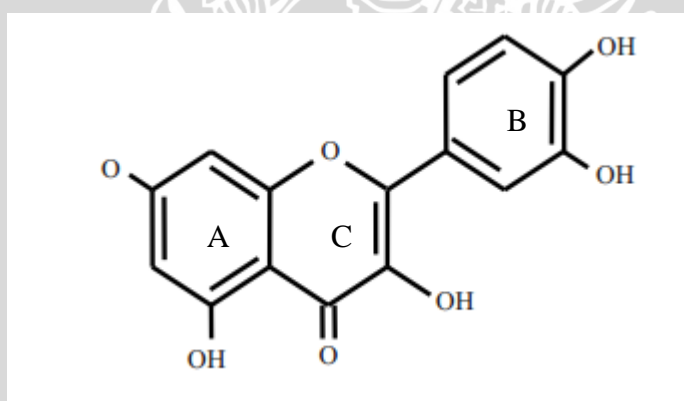
Daun kelor (*Moringa oleifera*) secara etnomedicine telah terbukti memiliki efek antikanker (Balachandran dan Rajgopal, 2005). Berdasarkan literatur yaitu Manguro and Lemmen (2007), diketahui bahwa pada ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) terdapat komponen spesifik flavanoid glikosida yang bersifat antikanker yaitu *4-(α -L-rhamnopyranosyloxy) benzyl glukosinolate*, *4-(α -L-rhamnopyranosyloxy) benzyl isothiocyanate*, *benzyl isothiocyanate*, *niamisin (thiocarbamates)*, *quercetin-3-O-glukoside* dan *kaempferol-3-O-glikoside*. Disebutkan bahwa quercetin dan kaempferol berperan sebagai antioksidan untuk melawan radikal bebas, dan niamicin (thiocarbamates) berfungsi sebagai agen kemopreventif. Dengan demikian, flavonoid dapat menghambat pertumbuhan sel dan meningkatkan apoptosis sel kanker.

2.6.3 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antioksidan dan memiliki bioaktivitas sebagai obat. Flavonoid tersusun

atas dua cincin aromatis yang dapat maupun tidak dapat membentuk cincin ketiga dengan susunan C₆-C₃-C₆- (Rohyami, 2008).

Flavonoid banyak terdapat pada buah dan sayur-sayuran dan dibedakan menjadi flavon, flavonol, isoflavon, flavonol, flavanon, dan flavonol. Flavonoid juga banyak ditemukan terkandung pada tanaman obat herbal serta telah banyak digunakan secara tradisional (Ren *et al.*, 2003). Flavonoid yang biasa ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi yaitu flavon dan flavonol dengan C- dan O-glikosida, isoflavon C- dan O- glikosida, flavanon C- dan O-glikosida, khalkon dengan C- dan O-glikosida, dan dihidrokhalkon. Senyawa flavonoid, terutama bentuk glikosida, umumnya mudah larut dalam air sehingga dapat diekstrak dengan menggunakan pelarut air (Rohyami, 2008).

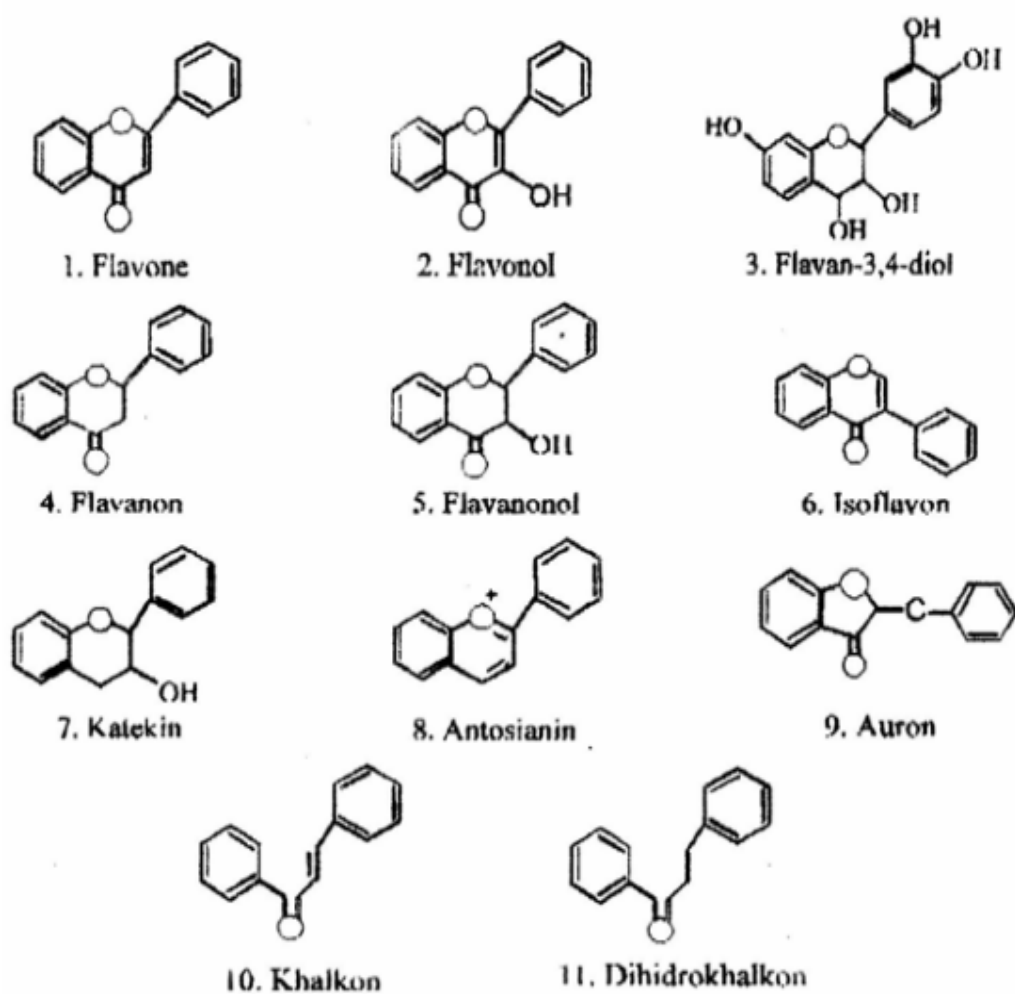


Gambar 2.4. Struktur Flavonoid (Redha, 2010)

Keterangan : A : cincin aromatik A

B : cincin aromatik B

C : cincin heterosiklik mengandung oksigen



Gambar 2.5. Struktur kimia jenis flavonoid (Nugrahaningtyas, 2005)

Tabel 2.3 Jenis flavonoid (Ren et al., 2003)

Sub Kelompok Flavonoid	Anggota Flavonoid
Flavanol	Kaempferol, myrisetin, quersetin, rutin
Flavon	Apigenin, chrisin, luteolin
Isoflavon	Daidzein, genistein, glycitein, formononetin
Flavonol	Katekin, gallokatekin
Flavonon	Eriodictyol, hesperin, narigenin
Flavanonol	Taxifolin

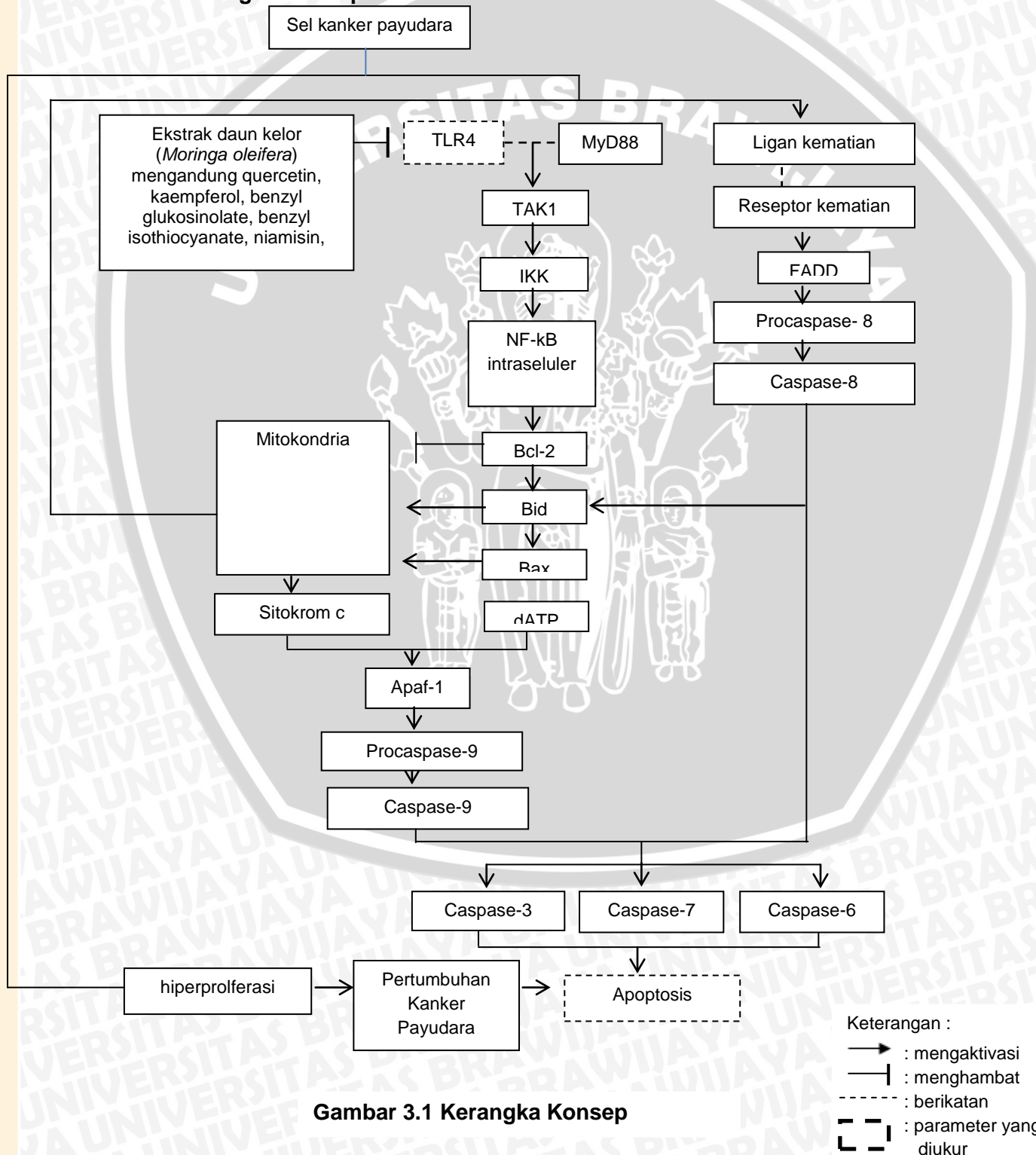
Berdasarkan studi *in vitro*, diketahui bahwa flavonoid dapat menghambat proses karsinogenesis pada sel kanker paru-paru, payudara, tiroid, prostat, dan kanker kolon. Pada sel kanker payudara MCF-7, flavonoid yang berperan yaitu flavanonon, daidzein, genistein, quersetin, dan luteolin. Studi *in vivo* pada hewan, flavonoid diketahui dapat menghambat karsinogenesis dengan mempengaruhi proses inisiasi, promosi, dan progresifitas kanker. Flavonoid dapat menginduksi apoptosis dengan menghambat aktivitas DNA topoisomerase I/II, mengurangi ROS, melepaskan sitokrom c dengan mengaktifasi *caspase-9* dan *caspase-3*, menurunkan ekspresi regulasi Bcl-2 dan Bcl-XL, meningkatkan ekspresi Bax dan NF- κ B, mengaktifasi endonuklease, dan mensupresi protein Mcl (Ren et al., 2003).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

Sel kanker terbentuk melalui 2 jalur, yaitu hiperproliferasi sel dan hambatan apoptosis. Hiperproliferasi dari sel secara langsung dapat menyebabkan kanker, sedangkan jalur apoptosis melibatkan banyak protein, maupun reseptor tergantung stimulasi pada jalur yang berbeda. Jalur apoptosis terdiri dari 2 jalur yaitu intrinsik dan ekstrinsik. Pada jalur ekstrinsik, ligan kematian seperti TNF- α , TRAIL, dan FASL akan berikatan dengan reseptor kematian yaitu TNF-R, DR4/DR5, dan FAS sehingga akan membentuk kompleks FADD. Kompleks FADD memicu aktivasi dari *caspase-8*, *caspase-3*, *caspase-7*, sehingga terjadi apoptosis. Jalur intrinsik melibatkan protein-protein seperti Bcl-2, Bid, serta Bax, dimana aktivasi protein Bid bisa disebabkan oleh aktivasi dari *caspase-8* pada jalur ekstrinsik. Aktivasi Bid menyebabkan terjadinya translokasi Bid ke dalam mitokondria. Akibatnya, terjadi pelepasan sitokrom c, aktivasi *caspase-9*, *caspase-3*, *caspase-7*, sehingga terjadi apoptosis. Hambatan yang terjadi pada jalur apoptosis ini akan memicu kanker disertai dengan adanya peningkatan proliferasi sel.

Terjadinya kanker dapat dipicu oleh substansi-substansi karsinogen, maupun senyawa patogen. Karsinogen atau senyawa patogen pertama kali akan direspon oleh reseptor yaitu *Toll-like receptor 4* (TLR4) yang ada di permukaan sel. Sel kanker diketahui mengekspresikan TLR4 dimana ekspresi tersebut diawali oleh adanya aktivasi TLR4. Interaksi sinyal dengan reseptor diawali dengan adanya stimulus yaitu Hsp70 yang berikatan dengan bagian ekstraseluler TLR4. Ikatan tersebut memicu penggabungan TLR4 dengan protein adaptor *myeloid differentiation primary response protein 88* (MYD88) sehingga teraktivasinya *transforming growth factor β activated kinase* (TAK1). Aktivasi TAK1 memicu perekrutan I κ B kinase (IKK) kompleks. IKK kompleks merupakan

enzim kompleks pemicu respon seluler menjadi inflamasi. Fosforilasi IKK menyebabkan degradasi I κ B, sehingga mengakibatkan translokasi Nf- κ B ke dalam inti sel dan mengaktivasi gen targetnya. Aktivasi gen target seperti Bcl-2 dan hambatan translokasi Bid dan Bax ke mitokondria selanjutnya akan memediasi proliferasi sel, respon inflamasi, serta menghambat pelepasan sitokrom c sehingga tidak akan terjadi apoptosis sel. Dengan mekanisme tersebut, TLR4 dapat memicu hambatan dari apoptosis.

Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) yang mengandung quersetin dalam ekstrak daun kelor dapat menghambat ekspresi TLR4 sehingga akan meningkatkan proses apoptosis, yaitu meningkatkan terjadinya apoptosis sel kanker payudara.

3.2 Hipotesis Penelitian

- 1) Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan ekspresi TLR4 pada sel MCF-7 .
- 2) Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat meningkatkan apoptosis pada sel MCF-7.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan rancangan *experimental in vitro post-test only* menggunakan *control group design* untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun kelor dalam menurunkan ekspresi TLR4 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. Dalam penelitian ini dilakukan pengujian yaitu uji penentuan IC_{50} dengan *MTT Assay*, uji ekspresi TLR4 dengan immunositokimia, dan uji apoptosis sel MCF-7 dengan *TUNEL Assay* menggunakan dosis $\frac{1}{2} IC_{50}$, IC_{50} , $2x IC_{50}$, serta kontrol (tanpa antibodi primer).

4.2.1 Penentuan IC_{50} menggunakan *MTT Assay*

Perhitungan pengulangan *MTT* 1 (Nazir, 2004) :

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

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

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

$$21n \geq 15 + 21$$

$$n \geq 1.71$$

Keterangan :

t : Jumlah Perlakuan

n : jumlah pengulangan

Perhitungan pengulangan MTT 2:

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

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

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

$$29n \geq 15 + 29$$

$$n \geq 1,52$$

keterangan :

t : Jumlah Perlakuan

n : jumlah pengulangan

Pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini harus lebih dari 1,52 sehingga dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Berikut merupakan tabel 4.2 pembagian kelompok sampel MTT2 (Lampiran 17) :

4.2.2 Pengujian Ekspresi TLR4 dengan metode Imunositokimia

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

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

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 15 + 3$$

$$n \geq 6$$

Keterangan :

t : Jumlah Perlakuan

n : jumlah pengulangan

Pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebanyak 6 kali, maka banyaknya sampel yang akan digunakan adalah :

Tabel 4.1 Pembagian Kelompok Perlakuan Imunositokimia

No	Kelompok	Perlakuan
1	Kontrol negatif	Sel MCF-7 tanpa pemberian terapi
2	Kontrol media	Sel MCF-7 diberi ekstrak daun kelor (<i>M.oleifera</i>) dengan konsentrasi sesuai IC_{50}
3	I	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor konsentrasi dua kali IC_{50}
4	II	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan konsentrasi setengah kali IC_{50}

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

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

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah ekspresi TLR4 dan apoptosis sel MCF-7

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan bulan Februari – Juni 2014. Proses ekstraksi daun kelor dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Brawijaya, Malang, kultur sel MCF-7 dan *MTT* Assay dilakukan di Laboratorium Pengujian dan Penelitian Terpadu Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, uji ekspresi TLR4 dan apoptosis dilakukan di Laboratorium Biokimia FKUB, Universitas Brawijaya, Malang.

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Kultur Sel MCF-7

Sel MCF-7, medium DMEM 1640, penicillin-streptomycin, FBS (Fetal Bovine Serum), PBS (Phosphate Buffer Saline), Sodium Bicarbonate, HCl,

Trypsine-EDTA, aquadest, spiritus, dan alkohol 70%, *Laminar air-flow*, inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%$ CO_2 , mikroskop *inverted*, 96-well *plates*, cover glass, *sentrifuge*, pipet disposable, mikro pipet (*blue tip*, *yellow tip*), pipet tetes steril, conical tube, syringe, hemasitometer, Filter $0.2 \mu\text{m}$, dan tissue

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

Serbuk simplisia daun kelor 100 gram, etanol 70% 1L. Wadah kaca tertutup 1,5ml 2 buah, wadah kaca tertutup 2,5ml 4 buah, stirer, kertas saring whatment-42/kertas flanel, timbangan, label, pipet tetes, *rotary evaporator*, *vacum dryer/oven*, cawan porselen, aluminium foil, corong, *blue tip*, *yellow tip* dan corong.

4.5.4 Penentuan Kualitatif Fitokimia

a. Uji Tanin

10 mg ekstrak kental daun kelor ditimbang menggunakan gelas arloji. Kemudian dilarutkan dalam 15 mL aquades. Ditambahkan 3 tetes reagen FeCl_3 . Diamati warna yang muncul. Ekstrak mengandung tannin apabila timbul warna biru kehitaman.

b. Uji Alkaloid

125 mg ekstrak kental daun kelor ditimbang menggunakan gelas arloji. Kemudian dilarutkan dalam 5 mL 1,5 v/v HCl. Disaring dengan kertas saring. Diambil sebanyak 2 mL. Ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendorff. Diamati warna yang muncul. Ekstrak mengandung alkaloid apabila timbul warna oranye kecoklatan.

c. Uji Fenol

50 mg ekstrak kental daun kelor ditimbang menggunakan gelas arloji. Kemudian dilarutkan dalam 5 mL aquades. Ditambahkan 2-3 tetes reagen FeCl_3 5%. Diamati warna yang muncul. Ekstrak mengandung fenol apabila timbul warna hijau kehitaman.

d. Uji Saponin

2 mL larutan ekstrak daun kelor diukur menggunakan gelas ukur. Kemudian ditambahkan 2 mL aquades. Dikocok selama 15 menit. Diamati adanya pembentukan busa. Ekstrak mengandung saponin apabila terbentuk lapisan busa tebal ± 1 cm dan stabil (tidak mudah hilang).

e. Uji Flavonoid

1 mL larutan ekstrak daun kelor diukur menggunakan gelas ukur. Kemudian ditambahkan 5% mL NaOH sebanyak 5 tetes. Diamati warna yang terbentuk. Ekstrak mengandung flavonoid apabila terbentuk warna kuning yang pekat. Selanjutnya, ditambahkan 2M HCl. Diamati warna yang terbentuk. Ekstrak mengandung flavonoid apabila terbentuk warna kuning yang lebih pudar.

f. Uji Terpenoid

5 mL larutan ekstrak daun kelor diukur menggunakan gelas ukur. Kemudian ditambahkan 2 mL kloroform. Ditambahkan H₂SO₄ pekat 2 mL. Ditambahkan 1 mL kloroform. Ditambahkan 1 mL H₂SO₄ pekat.. Diamati warna yang terbentuk. Ekstrak mengandung terpenoid apabila terbentuk warna coklat kemerahan pada permukaan larutan.

4.5.5 Penentuan IC₅₀ Menggunakan MTT Assay

Plat 96-well dengan volume 100 µl/well, inkubator, larutan MTT, solubilization solution, spektrofotometer.

4.5.6 Penentuan Ekspresi TLR4 dengan Metode Imunositokimia

Sel MCF-7, incubator CO₂, Stok sampel (10 mg) dalam eppendorf, DMSO, DMEM 1640, PBS, metanol, larutan hidrogen peroksida, novostain universal detection kit, antibodi monoklonal primer untuk TLR4, 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 Metode TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labelling) 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 Operasional

- 1) **Serbuk daun kelor** diperoleh dari Balai Materia Medika (BMM) , Batu, Malang, Jawa Timur
- 2) **Ekstrak daun kelor** diperoleh melalui ekstraksi maserasi menggunakan pelarut ethanol 70%.
- 3) **Sel MCF-7** diperoleh Laboratorium Pengujian dan Penelitian Terpadu (LPPT) Universitas Gajah Mada , Yogyakarta.
- 4) **IC₅₀** adalah dosis daun kelor (*Moringa oleifera*) yang dapat menyebabkan hambatan aktivitas proliferasi sel MCF-7 sebanyak 50%. Dosis IC₅₀ ditentukan melalui pengujian *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide* Assay atau MTT Assay.
- 5) **Immunositokimia** dilakukan dengan immunostaining, kemudian dilihat ekspresi TLR4 berdasarkan warna yang tampak yaitu inti, membran sel, dan sitoplasma bewarna coklat.
- 6) **Apoptosis** diuji menggunakan TUNEL Assay (sel yang apoptosis bewarna coklat)

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Kultur sel MCF-7 (CCRC, 2013)

4.7.1.1 Penumbuhan sel

Prosedur kerja penumbuhan sel sebagai berikut,

- 1) Menyiapkan aliquot 3 mL DMEM 1640 dalam *conical tube* steril

- 2) Mengambil ampul (*cryo tube*) yang berisi sel MCF-7 dari tangki nitrogen cair
- 3) Mencairkan suspensi sel dalam *cryo tube* pada suhu kamar hingga tepat mencair
- 4) Mengambil suspensi sel dengan mikropipet 1 ml (blue tip), masukkan tetes demi tetes ke dalam DMEM 1640 yang telah disiapkan dalam *conical tube*
- 5) Menutup *conical tube* dengan rapat. Sentrifugasi dengan sentrifus untuk *conical tube* (tanpa pendingin) pada 1000 rpm selama 5 menit sebanyak 2 kali
- 6) Kembali ke dalam LAF, menyemprot *conical tube* dan tangan dengan alkohol 70 %
- 7) Membuka *conical tube*, tuang supernatan DMEM 1640 ke dalam pembuangan
- 8) Menambahkan 4 ml DMEM 1640 baru, meresuspensi kembali sel hingga homogen
- 9) Mentransfer masing-masing 2 ml suspensi sel ke dalam 2 *cell culture dish*
- 10) Menambahkan masing-masing 5 ml DMEM 1640 ke dalam dish, dihomogenkan dan diamati kondisi sel dengan mikroskop, pastikan sel homogen pada seluruh permukaan *dish*)
- 11) Memberi penandaan dan simpan sel ke dalam inkubator inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$

4.7.1.2 Pergantian Media

Prosedur pergantian media sebagai berikut :

- 1) Mengaliquot PBS dan DMEM 1640 di dalam *conical tube*
- 2) Membuang media lama secara perlahan dengan pipet Pasteur
- 3) Menuang 3 ml PBS ke dalam *dish*, goyang-goyangkan *dish* ke kanan dan ke kiri untuk mencuci sel
- 4) Membuang PBS dengan pipet Pasteur
- 5) Menuang 7 ml DMEM 1640 ke dalam *dish* yang berisi sel
- 6) Mengamati kondisi dan jumlah sel secara kualitatif pada mikroskop *inverted*
- 7) Inkubasi semalam dan amati keadaan sel keesokan harinya

4.7.1.3 Pemanenan Sel

Prosedur pemanenan sel sebagai berikut,

- 1) Mengambil sel dari inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%$ CO_2 diamati kondisi sel, panen sel dilakukan setelah sel 80% konfluen
- 2) Membuang media dengan menggunakan pipet pasteur steril
- 3) Mencuci sel 2 kali dengan PBS 1x (volume PBS adalah $\pm \frac{1}{2}$ volume media awal)
- 4) Menambahkan tripsin-EDTA 1x (tripsin 0,25%) secara merata dan inkubasi di dalam inkubator selama 3 menit
- 5) Menambahkan DMEM 1640 ± 5 mL untuk menginaktifkan tripsin, meresuspensi sel dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu
- 6) Mengamati keadaan sel di mikroskop, resuspensi kembali jika masih ada sel yang menggerombol

- 7) Mentransfer sel yang telah lepas satu-satu ke dalam *conical* steril baru

4.7.1.4 Perhitungan Sel

Prosedur perhitungan sel sebagai berikut,

- 1) Mengambil sel dari inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$, diamati kondisi sel
- 2) Membuang media dengan menggunakan pipet pasteur steril
- 3) Mencuci sel 2 kali dengan PBS 1x (volume PBS + $\frac{1}{2}$ volume media awal
- 4) Tambahkan tripsin-EDTA 1x (tripsin 0,25%) secara merata dan inkubasi di dalam inkubator selama 3 menit
- 5) Menambahkan media kurang lebih 2-3 ml untuk menginaktifkan tripsin, meresuspensi sel dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu
- 6) Mengamati keadaan sel di mikroskop, meresuspensi kembali jika masih ada sel yang menggerombol
- 7) Mentransfer sel yang telah lepas satu-satu ke dalam *conical* steril baru, tambahkan DMEM 1640 kurang lebih 2-3 ml, resuspensi sel
- 8) Mengambil 10 μl panen sel dan dipipetkan ke hemasitometer
- 9) Menghitung sel di bawah mikroskop (*inverted* atau mikroskop cahaya) dengan *counter*

4.7.1.5 Subkultur Sel

- 1) Prosedur subkultur sel sebagai berikut,
- 2) Melakukan panen sel sesuai dengan protokol panen sel
- 3) Meresuspensi suspensi sel di dalam *conical tube*

- 4) Mengambil 300 μ l panen sel dan masukkan ke dalam *conical* yang lain. menambahkan 7 ml DMEM 1640 dan meresuspensi kembali
- 5) Menuang sel ke dalam wadah (dish) yang telah disiapkan, dihomogenkan dan diamati kondisi dan jumlah sel secara kualitatif
- 6) Menginkubasi semalam dan mengganti DMEM 1640 esok harinya, diamati keadaan sel sebelum dan setelah diganti media

4.7.2 Maserasi Daun Kelor

100 gram serbuk daun kelor (*Moringa oleifera*) dilarutkan dengan 1L etanol hingga seluruh serbuk terendam, didiamkan selama 24 jam. Dilakukan pengadukan pada 30 menit pertama pada suhu ruang. Campuran disaring menggunakan kertas saring dan dihasilkan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) (Parvathy dan Umamaheshwari, 2007). Selanjutnya, filtrat ekstrak yang diperoleh dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* selama 3 hari pada suhu 40°C. Ekstrak ditimbang dan disimpan pada suhu 4°C (Bandar, *et al.*, 2013).

4.7.3 Pemaparan Ekstrak Daun Kelor pada Kultur Sel

- 1) Mengencerkan ekstrak daun kelor dengan jumlah dan konsentrasi yang diinginkan di medium sel MCF-7.
- 2) Menambahkan larutan ekstrak daun kelor ke dalam plate, mendiamkan selama 24 jam.
- 3) Larutan ekstrak daun kelor dicuci dengan medium sel kembali.

4.7.4 Penentuan Kualitatif Fitokimia

a. Uji Tanin

10 mg ekstrak kental daun kelor ditimbang menggunakan gelas arloji. Kemudian dilarutkan dalam 15 mL aquades. Ditambahkan 3 tetes reagen FeCl_3 . Diamati warna yang muncul. Ekstrak mengandung tannin apabila timbul warna biru kehitaman.

b. Uji Alkaloid

125 mg ekstrak kental daun kelor ditimbang menggunakan gelas arloji. Kemudian dilarutkan dalam 5 mL 1,5 v/v HCl. Disaring dengan kertas saring. Diambil sebanyak 2 mL. Ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendorff. Diamati warna yang muncul. Ekstrak mengandung alkaloid apabila timbul warna oranye kecoklatan.

c. Uji Fenol

50 mg ekstrak kental daun kelor ditimbang menggunakan gelas arloji. Kemudian dilarutkan dalam 5 mL aquades. Ditambahkan 2-3 tetes reagen FeCl_3 5%. Diamati warna yang muncul. Ekstrak mengandung fenol apabila timbul warna hijau kehitaman.

d. Uji Saponin

2 mL larutan ekstrak daun kelor diukur menggunakan gelas ukur. Kemudian ditambahkan 2 mL aquades. Dikocok selama 15 menit. Diamati adanya pembentukan busa. Ekstrak mengandung saponin apabila terbentuk lapisan busa tebal ± 1 cm dan stabil (tidak mudah hilang).

e. Uji Flavonoid

1 mL larutan ekstrak daun kelor diukur menggunakan gelas ukur. Kemudian ditambahkan 5% mL NaOH sebanyak 5 tetes. Diamati warna yang terbentuk. Ekstrak mengandung flavonoid apabila terbentuk warna kuning yang pekat. Selanjutnya, ditambahkan 2M HCl. Diamati warna yang terbentuk. Ekstrak mengandung flavonoid apabila terbentuk warna kuning yang lebih pudar.

f. Uji Terpenoid

5 mL larutan ekstrak daun kelor diukur menggunakan gelas ukur. Kemudian ditambahkan 2 mL kloroform. Ditambahkan H₂SO₄ pekat 2 mL. Ditambahkan 1 mL kloroform. Ditambahkan 1 mL H₂SO₄ pekat. Diamati warna yang terbentuk. Ekstrak mengandung terpenoid apabila terbentuk warna coklat kemerahan pada permukaan larutan.

4.7.5 Penentuan IC₅₀ Menggunakan MTT Assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide Assay)

Pengujian menggunakan 96 sumur, dimana tiap pengkondisian harus dilakukan 3 kali atau lebih, sebagai berikut,

- 1) Serbuk MTT sebanyak 5 mg ditambahkan dengan 1 ml PBS kedalam falcon
- 2) (1) ditambahkan medium DMEM sebanyak 9 ml
- 3) Medium DMEM dalam *well-plate* berisi sel dibuang dengan mikropipet
- 4) (2) diambil 100 µl dan ditambahkan pada masing-masing *well-plate* pada nomor (3)
- 5) (4) diinkubasi selama 4-6 jam pada suhu 37° C dengan kadar ± 5%

CO₂

- 6) (5) ditambahkan *stop solution* dan diinkubasi selama 24 jam
- 7) Membaca absorbansi pada panjang gelombang 550 nm menggunakan ELISA Reader
- 8) Dihitung persen kematian sel menggunakan rumus :

$$\text{Dosis} = \frac{\text{Rata-rata Absorbansi kontrol sel} - \text{Rata-rata Absorbansi dosis } x}{\text{Rata-rata Absorbansi kontrol sel}} \times 100\%$$

4.7.6 Pengujian Apoptosis Menggunakan TUNEL Assay

Prosedur kerja TUNEL Assay sebagai berikut,

- 1) Sel dipreparasi dengan *fixation solution* selama 1 jam ± 25° C
- 2) Dicuci dengan PBS
- 3) Diinkubasi dengan *blocking solution* 10 menit 15-25° C
- 4) Dicuci dengan PBS
- 5) Diinkubasi dengan *permeabilisation solution* 2 menit di es dengan suhu 2-8° C
- 6) Dicuci PBS sebanyak 2 kali
- 7) Dikeringkan sekitar sampel dengan tissue
- 8) Ditambah TUNEL *Reaction Mixture* 25 mL
- 9) Ditutup dan diinkubasi 60 menit 37° C
- 10) Dicuci PBS sebanyak 3 kali
- 11) Dialiri PBS
- 12) Diamati di mikroskop *fluorescence* 450-500 nm dan dideteksi pada 515-565 nm
- 13) Dikeringkan sekitar sampel dengan tissue

- 14) Ditambahkan 25 μ l *converter* POD
- 15) Diinkubasi pada tempat lembab 10 menit 37 °C
- 16) Dicuci PBS sebanyak 3 kali
- 17) Diinkubasi 10 menit 15-25 °C
- 18) Dicuci PBS sebanyak 3 kali
- 19) Ditambahkan *Maye Hematoxylin*, kemudian dibilas aquades
- 20) Dikeringkan sekitar sampel dengan tissue
- 21) Ditutup dengan coverslip dengan entellan

4.7.7 Pengujian Ekspresi TLR4 Menggunakan Metode Imunositokimia

(Nethercott *et al.*, 2011)

Prosedur kerja imunositokimia TLR4 sebagai berikut,

- 1) Diambil sel MCF-7 dari inkubator CO₂, diamati kondisi sel.
- 2) Dipanen sel sesuai dengan protokol panen.
- 3) Dihitung jumlah sel MCF-7 sesuai dengan protokol penghitungan sel (jumlah sel yang dibutuhkan untuk uji imunositokimia adalah 5x10⁴ sel/sumuran (5x10⁴ sel/1000 μ l DMEM 1640)).
- 4) Dibuat pengenceran suspensi sel sehingga konsentrasi sel akhir 5x10⁴ sel/1000 μ l DMEM 1640.
- 5) Disiapkan 24 *well plate* dan *cover slip*.
- 6) Dimasukkan *cover slip* sejumlah yang dibutuhkan ke dalam sumuran menggunakan pinset dengan hati-hati.
- 7) Ditransfer 1000 μ l DMEM 1640 suspensi sel ke atas *cover slip*.
- 8) Diamati keadaan sel di mikroskop untuk melihat distribusi sel.
- 9) Diinkubasi sel di dalam inkubator selama semalam.

- 10) Dibuat tiga konsentrasi sampel (ekstrak daun kelor (*M. oleifera*)), yaitu pada IC_{50} , dua kali IC_{50} , dan setengah kali IC_{50} , untuk perlakuan sebanyak 1000 μ l. Untuk imunositokimia, minimal diperlukan 3 perlakuan : a. Perlakuan dengan ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) , b. Kontrol sel tanpa antibodi primer (akan menunjukkan warna 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 dengan pipet tetes secara perlahan-lahan.
- 13) Diisikan PBS *Qualified* masing-masing 500 μ l ke dalam sumuran untuk mencuci sel.
- 14) Dibuang PBS dari sumuran dengan pipet tetes secara perlahan.
- 15) Dimasukkan tiga sampel dengan konsentrasi ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) sesuai poin 10 sebanyak 1000 μ l ke dalam sumuran.
- 16) Dimasukkan 1000 μ l media kultur untuk kontrol sel.
- 17) Diinkubasi di dalam inkubator 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 dengan pipet tetes secara perlahan.
- 22) Disikan PBS 500 μ l ke dalam masing-masing sumuran secara perlahan untuk mencuci sel.

- 23) Dibuang PBS dari sumuran dengan pipet tetes secara perlahan.
- 24) Diambil *cover slip* menggunakan pinset dengan bantuan ujung jarum dengan hati-hati.
- 25) Diletakkan di dalam sumuran *6-well plate* bekas atau *dish* bekas yang bersih.
- 26) Diberi label pada masing-masing sumuran.
- 27) Ditetaskan 300 μ l metanol dingin, diinkubasi 10 menit di dalam *freezer*.
- 28) Diberikan metanol secara perlahan, jangan sampai *cover slip* terbalik.
- 29) Ditambahkan 500 μ l PBS pada *cover slip*, didiamkan selama 5 menit, diambil dan dibuang PBS dengan mikropipet 1 ml, dilakukan pencucian dengan PBS 2 kali.
- 30) Ditambahkan 500 μ l akuades, didiamkan selama 5 menit, dibuang akuades, dilakukan pencucian dengan akuades 2 kali.
- 31) Ditetaskan larutan hidrogen peroksida (*blocking solution*), diinkubasi selama 10 menit, dibuang larutan dengan mikropipet.
- 32) Ditetaskan *prediluted blocking serum*, diinkubasi selama 10 menit, dibuang larutan.
- 33) Ditetaskan antibodi monoklonal primer untuk antigen yang ingin diamati, yaitu untuk TLR4.
- 34) Ditambahkan 500 μ l PBS, diinkubasi selama 5 menit, dibuang PBS.
- 35) Ditetaskan antibodi sekunder yang dilabel biotin (*biotinylated universal secondary antibody*), diinkubasi selama 10 menit.
- 36) Ditambahkan 500 μ l PBS, diinkubasi selama 5 menit, dibuang PBS.

- 37) Diteteskan reagen yang berisi kompleks streptavidin-enzim peroksidase, diinkubasi selama 10 menit.
- 38) Ditambahkan 500 μ l PBS, diinkubasi selama 5 menit, dibuang PBS.
- 39) Diteteskan larutan substrat kromogen DAB, diinkubasi selama 10 menit.
- 40) Ditambahkan 500 μ l akuades, kemudian dibuang kembali.
- 41) Diteteskan larutan MayeHaematoxylin, diinkubasi selama 3 menit.
- 42) Ditambahkan 500 μ l akuades, kemudian dibuang kembali.
- 43) Diangkat *cover slip* dengan pinset secara hati-hati, kemudian dicelupkan dalam xylol.
- 44) Dicelupkan *cover slip* dalam alkohol lalu dikeringkan *cover slip*.
- 45) Diletakkan *cover slip* di atas *object glass*, di tetesi dengan lem (*mounting media*). Ditutup *cover slip* dengan *cover slip* kotak.
- 46) Diamati ekspresi protein dengan mikroskop cahaya.

4.8 Analisis Data

Data yang telah terkumpul diolah dan dilakukan analisis uji yang disebut 'Asumsi Dasar' yaitu uji normalitas dan uji homogenitas. Uji 'Asumsi Dasar' digunakan untuk mengetahui pola dan varian suatu data. Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas dilakukan menggunakan rumus dari Kolmogorov-Smirnov melalui program SPSS. Distribusi data dikatakan normal bila hasil signifikansi lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$). Bila data berdistribusi normal, maka digunakan uji statistik parametrik. Uji homogenitas dilakukan untuk mengetahui apakah data memiliki varian yang sama. Uji homogenitas dilakukan menggunakan tingkat kepercayaan

95%. Bila data memiliki varian yang sama maka selanjutnya dilakukan uji ANOVA.

Uji ANOVA yang digunakan adalah *one way ANOVA*, yaitu analisis varian untuk menguji rata-rata perlakuan suatu percobaan yang menggunakan 1 faktor, dimana 1 faktor tersebut memiliki 3 atau lebih kelompok. Analisis data dilakukan untuk mengetahui perbedaan rata-rata jumlah sel yang mengalami apoptosis dan mengalami penurunan ekspresi TLR4 terhadap perlakuan yang diberikan.

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

H0 : Tidak terjadi apoptosis sel MCF-7 setelah diberikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*).

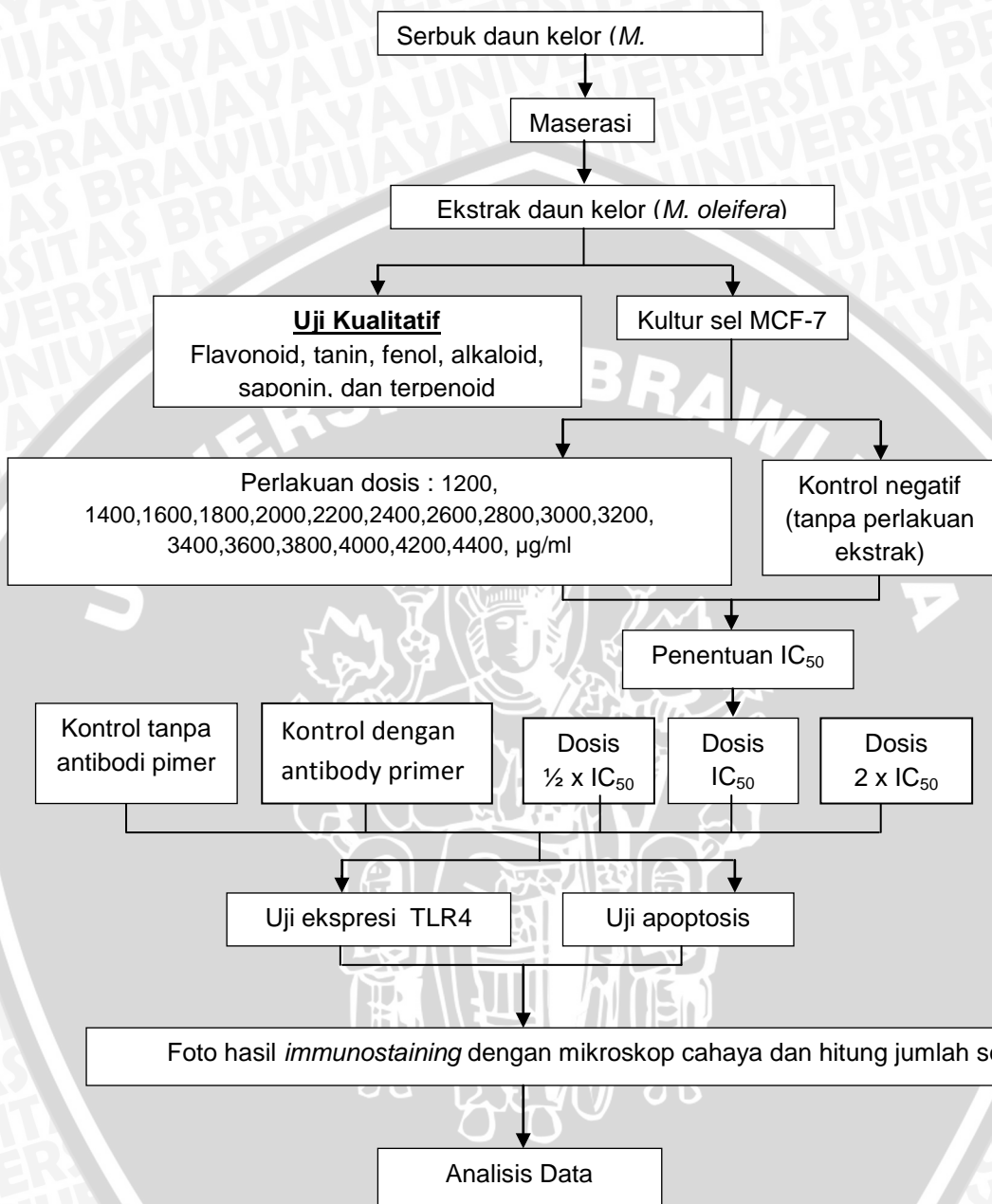
H1 : Terjadi apoptosis sel MCF-7 setelah diberikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*).

Sedangkan hipotesis statistik ekspresi TLR4 adalah :

H0 : Tidak terjadi penurunan ekspresi TLR4 pada sel kultur MCF-7 setelah diberikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*).

H1 : Terjadi penurunan ekspresi TLR4 pada sel kultur MCF-7 setelah diberikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*).

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Bagan Alur Penelitian

BAB 5

HASIL DAN ANALISIS

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil Ekstraksi dan Uji fitokimia

Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) yang diperoleh melalui proses maserasi 100 gram serbuk daun kelor adalah sekitar 37,81 gram. Dilihat secara organoleptik, ekstrak berwarna hijau tua kehitaman, kental, dan berbau tajam khas daun kelor (*Moringa oleifera*). Untuk mengetahui kandungan kimia yang terdapat di dalam ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*), maka dilakukan Uji Fitokimia secara kualitatif. Berikut adalah hasil uji fitokimia daun kelor :

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

Kandungan yang diuji	Hasil
Alkaloid	Positif (+)
Fenol	Positif (+)
Tannin	Positif (+)
Saponin	Positif (+)
Flavonoid	Positif (+)
Terpenoid	Negatif (-)

Berdasarkan hasil Uji Fitokimia pada **Tabel 5.1**, dapat diketahui bahwa ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) mengandung alkaloid, fenol, tannin, saponin, dan flavonoid. Namun ekstrak tidak mengandung terpenoid karena saat diuji hasilnya negatif atau tidak terbentuk warna coklat kemerahan pada permukaan larutan (Lampiran 3).

5.1.2 Penentuan IC₅₀ (MTT Assay)

Untuk menentukan IC₅₀, sel ditanam dalam 96 *well-plate*, terdiri dari kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan ekstrak dan kelompok yang diberikan perlakuan ekstrak. Dosis yang digunakan yaitu 1200 µg/ml, 1250 µg/ml, 1400 µg/ml, 1600 µg/ml, 1800 µg/ml, 2000 µg/ml, 2200 µg/ml, 2400 µg/ml, 2600 µg/ml, 2800 µg/ml, 3000 µg/ml, 3200 µg/ml, 3400 µg/ml, 3600 µg/ml, 3800 µg/ml, 4000 µg/ml, 4200 µg/ml, 4400 µg/ml, 4600 µg/ml, 4800 µg/ml, 5000 µg/ml, 5200 µg/ml, 5400 µg/ml, 5600 µg/ml, 5800 µg/ml, 6000 µg/ml, 6200 µg/ml, 10000 µg/ml, dan 20000 µg/ml.

Aktivitas proliferasi sel diketahui dengan mengukur absorbansi yang terbaca pada ELISA *Reader*, kemudian dihitung hasil rata-rata aktivitas proliferasi sel pada setiap kelompok. Hasil pengukuran rata-rata aktivitas proliferasi sel ditampilkan pada **tabel 5.2**.

Tabel 5.2 Data MTT Assay

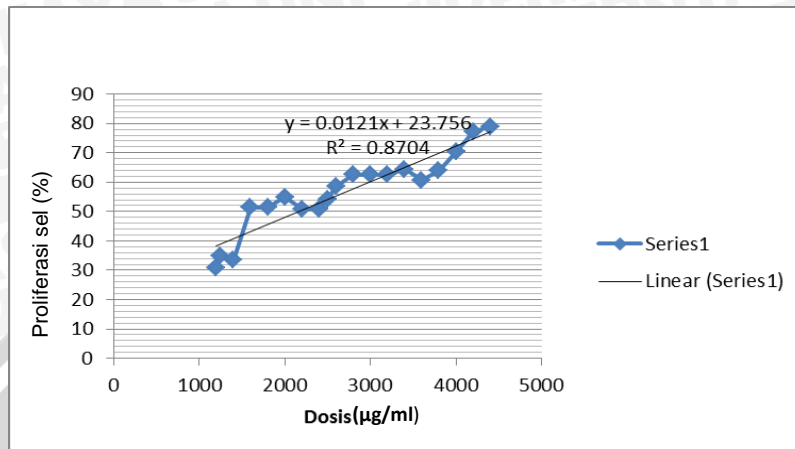
Dosis ($\mu\text{g/ml}$)	Proliferasi sel (%)
1200	30,90
1250	34,93
1400	33,40
1600	51,34
1800	51,34
2000	54,90
2200	50,86
2400	50,86
2500	54,17
2600	58,58
2800	62,62
3000	62,50
3200	62,62
3400	64,50
3600	60,78
3800	63,97
4000	70,30
4200	77,07
4400	79,04
4600	80,30

4800	80,90
5000	78,68
5200	79,40
5400	79,90
5600	77,70
5800	75,25
6000	76,35
6200	76,35
10000	78,68
20000	75,00

Untuk menentukan dosis IC_{50} , data dimasukkan ke *Microsoft Excel* dan dibuat kurva linier sehingga diperoleh persamaan regresi yaitu :

$$y = 0.0121x + 23.756$$

$$R^2 = 0.8704$$

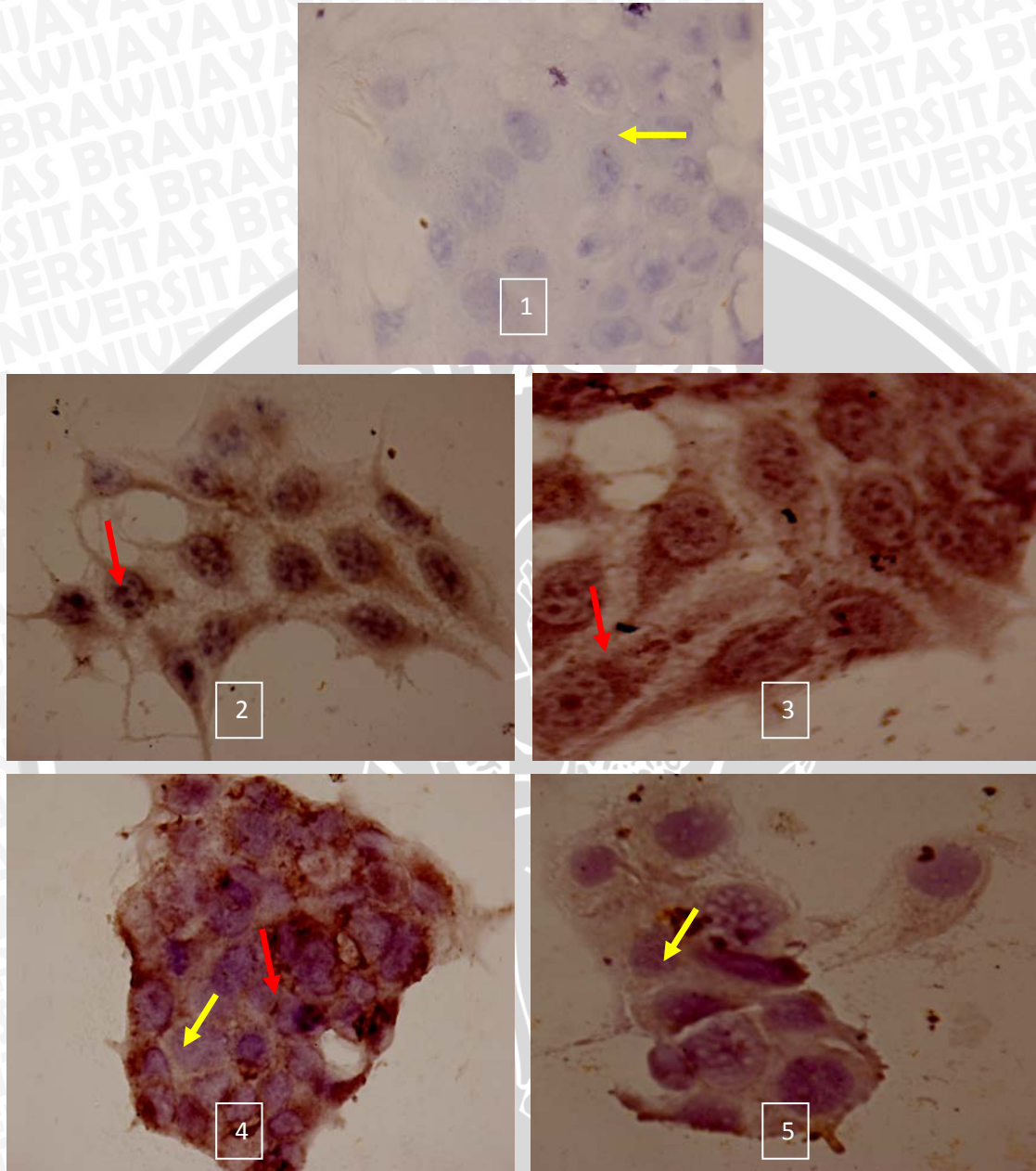


Gambar 5.1 Kurva Hubungan Dosis dengan Jumlah Sel MCF-7

Kemudian dilakukan perhitungan dengan persamaan regresi tersebut dan diperoleh dosis IC_{50} sebesar 2168 µg/ml (dibulatkan menjadi 2200 µg/ml).

5.1.3 Hasil Pengujian Ekspresi TLR4 menggunakan Metode Imunositokimia

Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol (tanpa perlakuan ekstrak daun kelor), dosis $\frac{1}{2} IC_{50}$, IC_{50} , dan $2x IC_{50}$ dengan replikasi sebanyak 6 kali. Sebelum melakukan Imunositokimia, sel MCF-7 dipaparkan dengan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) selama 24 jam dengan dosis $\frac{1}{2} IC_{50}$, IC_{50} , dan $2x IC_{50}$ yaitu masing-masing sebanyak 1100 µg/ml, 2200 µg/ml, dan 4400 µg/ml. Ekspresi TLR4 diamati secara mikroskopik dengan melihat adanya warna kecoklatan pada membran sel dan sitoplasma. Penampakan mikroskopik masing-masing perlakuan dapat dilihat pada **Gambar 5.2**.

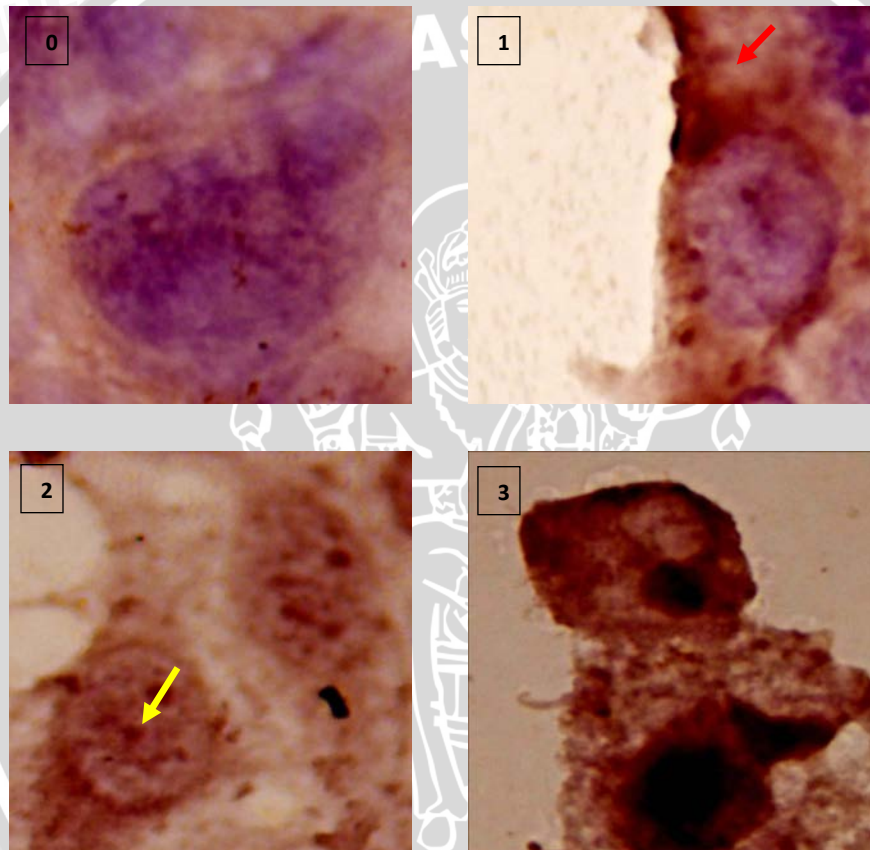


Gambar 5.4 Hasil Penampakan Mikroskopik Ekspresi TLR4 Hasil Imunositokimia menggunakan mikroskop cahaya (perbesaran 1000x).

Gambar (1) Kontrol tanpa antibodi primer, (2) Kontrol sel (tanpa perlakuan ekstrak), (3) Dosis $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ (1100 $\mu g/ml$), (4) Dosis $1 \times IC_{50}$ (2200 $\mu g/ml$), (5) Dosis $2 \times IC_{50}$ (4400 $\mu g/ml$)

Keterangan : Tanda panah merah menunjukkan sel yang mengekspresikan TLR4 ditandai dengan warna coklat pada membran sel dan sitoplasma. Tanda panah kuning menunjukkan sel yang tidak mengekspresikan TLR4 ditandai dengan warna ungu pada membran sel dan sitoplasma

Sistem perhitungan dalam penelitian dalam imunositokimia dilakukan dengan menggunakan derajat perhitungan yang ditetapkan oleh peneliti. Hasil pengamatan terhadap ekspresi TLR4 dapat dilihat pada **Gambar 5.5**. Intensitas dan distribusi sesuai gambar (1), (2), dan (3) akan diinterpretasikan sebagai sel yang mengekspresikan TLR4 yang terdapat pada membran sel dan sitoplasma.



Gambar 5.5 Ekspresi TLR4 Sel MCF-7 (Perbesaran 1000x).

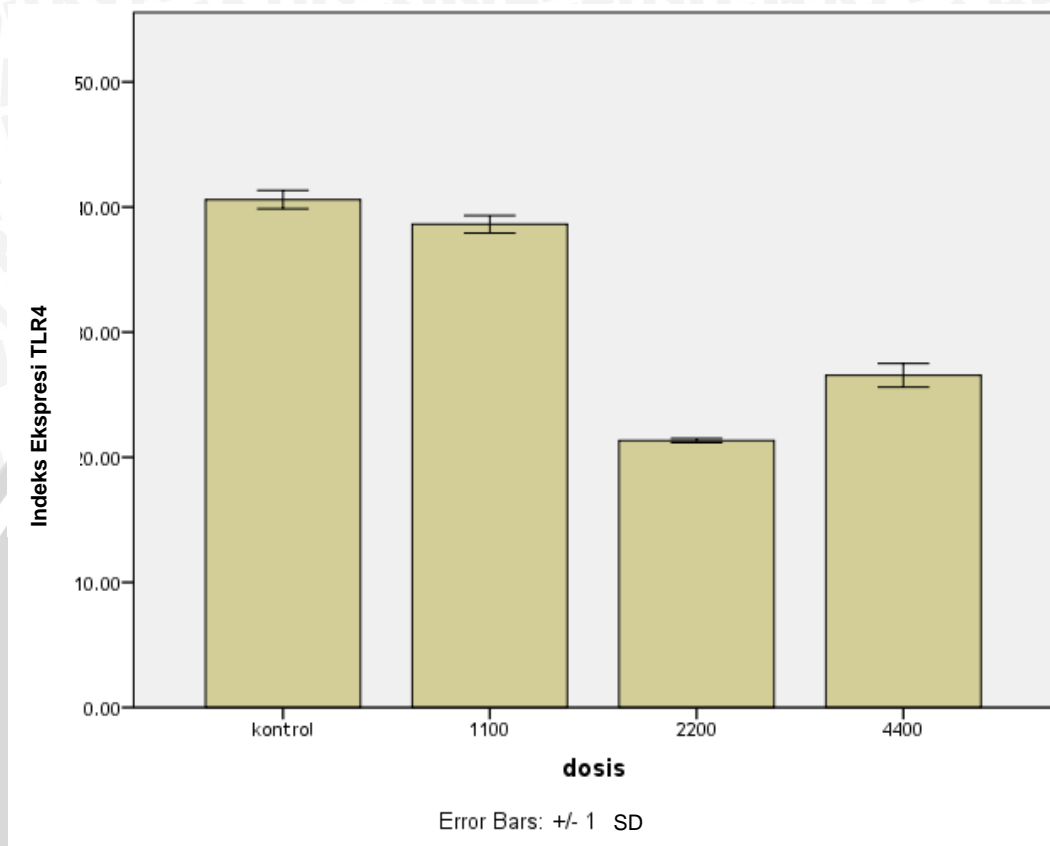
Gambar (0) tampak jelas nukleus dan membran sel berwarna ungu (1) nukleus tampak berwarna ungu dan terdapat warna coklat pada membran sel (panah kuning) dan sitoplasma (panah merah) (2) warna ungu pada nukleus tampak memudar dan terdapat warna coklat pada membran sel dan sitoplasma (3) tidak tampak lagi warna ungu pada nukleus, warna coklat tampak tebal pada nukleus, membran sel dan sitoplasma.

Indeks ekspresi TLR4 merupakan presentase perbandingan jumlah sel yang mengekspresikan TLR4 dengan jumlah sel keseluruhan dalam setiap lapang pandang (Lampiran 4). Selanjutnya, dilakukan perhitungan rata-rata pada setiap kelompok lapang pandang pada **Tabel 5.3**

Tabel 5.3 Nilai rata-rata ekspresi TLR4 kelompok perlakuan

Replikasi	Perlakuan			
	Kontrol	Konsentrasi 1100 µg/ml ($\frac{1}{2}$ IC ₅₀)	Konsentrasi 2200 µg/ml (1x IC ₅₀)	Konsentrasi 4400 µg/ml (2x IC ₅₀)
1	43,54	41,29	21,11	26,31
2	41,92	38,19	22,10	26,92
3	39,66	36,00	21,16	25,00
4	40,32	38,28	21,45	28,57
5	39,24	38,80	21,08	23,07
6	38,89	39,21	21,10	29,41
Rata-Rata ± SD	40,60 ± 1,79	38,62 ± 1,71	21,33 ± 0,40	26,55 ± 2,32

Berdasarkan tabel, nilai rata-rata dan standar deviasi kelompok kontrol yaitu $40,60 \pm 1,79$, kelompok dosis $\frac{1}{2}$ xIC₅₀ (1100 µg/ml) yaitu $38,62 \pm 1,71$, kelompok dosis 1x IC₅₀ (2200 µg/ml) yaitu $21,33 \pm 0,40$, dan kelompok dosis 2xIC₅₀ (4400 µg/ml) yaitu $26,55 \pm 2,32$. Data tersebut selanjutnya dibuat grafik.



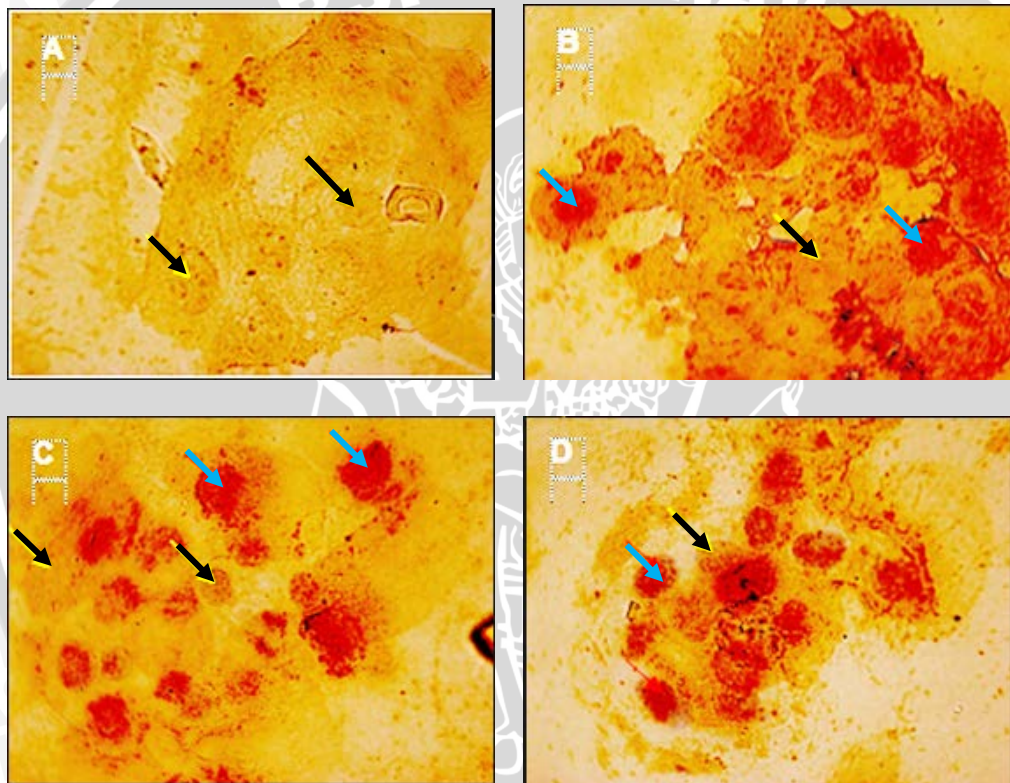
Gambar 5.6 Grafik Dosis Ekstrak terhadap Indeks Ekspresi TLR4

5.1.4 Hasil Pengujian Apoptosis menggunakan Metode TUNEL Assay

Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol (tanpa perlakuan ekstrak daun kelor), dosis $1/2$ IC₅₀, IC₅₀, dan 2x IC₅₀ dengan replikasi sebanyak 6 kali. Sebelum melakukan uji apoptosis, sel MCF-7 dipaparkan dengan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) selama 24 jam dengan dosis $1/2$ IC₅₀, IC₅₀, dan 2x IC₅₀ yaitu masing-masing sebanyak 1100 µg/ml, 2200 µg/ml, dan 4400 µg/ml. Kemudian sel yang mengalami apoptosis diamati secara mikroskopik dengan

melihat adanya warna kecoklatan pada inti sel. Penampakan mikroskopik masing-masing perlakuan dapat dilihat pada **Gambar 5.6**

Indeks apoptosis sel MCF-7 merupakan presentase perbandingan jumlah sel yang mengalami apoptosis dengan jumlah sel keseluruhan dalam setiap lapang pandang (Lampiran 5). Selanjutnya, dilakukan perhitungan rata-rata pada lapang pandang setiap kelompok (**Tabel 5.4**).



Gambar 5.6 Penampakan Mikroskopik Hasil TUNEL Assay Sel MCF-7 setelah Perlakuan. (A) Kontrol sel (tanpa perlakuan ekstrak), (B) Dosis 1100 $\mu\text{g/ml}$, (C) Dosis 2200 $\mu\text{g/ml}$, (D) Dosis 4400 $\mu\text{g/ml}$. Foto diambil menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x. Keterangan : tanda panah biru menunjukkan sel yang mengalami apoptosis yang ditandai dengan warna coklat gelap pada inti sel, sedangkan tanda panah hitam menunjukkan sel yang tidak mengalami apoptosis yang ditandai warna coklat terang pada inti sel.

Tabel 5.4 Nilai rata-rata dan Standar Deviasi kelompok perlakuan

Replikasi	Perlakuan			
	Kontrol	Konsentrasi 1100 µg/ml ($\frac{1}{2}$ IC ₅₀)	Konsentrasi 2200 µg/ml (1x IC ₅₀)	Konsentrasi 4400 µg/ml (2x IC ₅₀)
1	21,73	27,78	64	79,17
2	26,67	33,33	77,78	91,67
3	25	38,89	34,29	92,30
4	25	45,45	54,83	100
5	20	44,44	53,66	92,86
6	20	27,27	78,26	95,65
Rata-Rata ± SD	23,07 ± 1,17	36,19 ± 3,27	60,47 ± 6,81	91,94 ± 2,85

Berdasarkan tabel, nilai rata-rata dan standar deviasi kelompok kontrol yaitu $23,07 \pm 1,17$, kelompok dosis $\frac{1}{2} \times \text{IC}_{50}$ (1100 µg/ml) yaitu $36,19 \pm 3,27$, kelompok dosis $1 \times \text{IC}_{50}$ (2200 µg/ml) yaitu $60,47 \pm 6,81$, dan kelompok dosis $2 \times \text{IC}_{50}$ (4400 µg/ml) yaitu $91,94 \pm 2,85$.

5.2 Analisis Data

5.2.1 Hasil Penentuan IC₅₀ dengan MTT Assay

5.2.1.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis dengan SPSS menggunakan uji *One-way* ANOVA. Perhitungan data dilakukan dengan batas kepercayaan sebesar 95%. Untuk mengetahui normalitas data yang diperoleh, dilakukan uji *Shapiro-Wilk*, dan hasil yang diperoleh yaitu bahwa data tidak terdistribusi normal dengan nilai $p = 0.000$ ($p < 0.05$) (Lampiran 6). Setelah diuji

normalitasnya, data kemudian diuji homogenitasnya dan diperoleh hasil $p = 0.000$ ($p < 0.05$), sehingga dapat dikatakan bahwa data tidak homogen. Oleh karena data yang dihasilkan tidak terdistribusi normal dan tidak homogen, maka dilakukan uji korelasi non-parametrik *Spearman*.

5.2.1.2 Uji Spearman

Uji Spearman dilakukan untuk mengetahui hubungan antara berbagai dosis ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan jumlah kematian sel MCF-7 dalam persen. Hasil uji dengan Spearman menunjukkan nilai r sebesar 0.950, mendekati angka 1 (Lampiran 6), yang berarti bahwa ada hubungan yang bermakna antara pemberian berbagai dosis ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan persen kematian sel MCF-7. Kemudian untuk nilai sig.(2-tailed) atau nilai p yang dihasilkan adalah sebesar 0.000. Nilai p tersebut kurang dari 0.005 ($p < 0.05$), yang berarti ada hubungan yang sangat signifikan antara pemberian berbagai dosis ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan persen kematian sel MCF-7.

5.2.2 Hasil Pengujian Ekspresi TLR4 menggunakan Metode Imunositokimia

5.2.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Data ekspresi TLR4 pada sel MCF-7 dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan juga diuji homogenitasnya. Hasil uji menunjukkan bahwa data tidak terdistribusi normal dengan nilai $p = 0.002$ ($p > 0.05$) dan hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa data homogen dengan nilai $p = 0.1$ ($p > 0.05$ (Lampiran 7)). Oleh

karena data tidak terdistribusi normal, maka dilakukan uji non-parametrik Kruskal-Wallis.

5.2.2.2 Uji Kruskal- Wallis

Uji Kruskal Wallis dilakukan untuk mengetahui perbedaan antara berbagai dosis ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) yang diberikan terhadap jumlah sel yang mengekspresikan TLR4. Hasil uji ini menunjukkan nilai $p = 0.000$ ($p < 0.005$) (Lampiran 7), yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara berbagai dosis ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) yang diberikan terhadap jumlah sel yang mengekspresikan TLR4.

5.2.2.3 Uji Mann-Whitney

Uji ini dilakukan untuk mengetahui dosis manakah yang signifikan. Berdasarkan hasil uji, diketahui bahwa semua dosis signifikan. Dosis dikatakan signifikan apabila $Z < -1.96$ dan nilai $p < 0.05$ (Lampiran 17).

5.2.2.4 Uji Spearman

Untuk mengetahui besarnya pengaruh pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap jumlah sel yang mengekspresikan TLR4, maka dilakukan uji korelasi Spearman. Berdasarkan analisis korelasi tersebut, diperoleh angka signifikansi sebesar 0.000 ($p < 0.05$) (Lampiran 7), menandakan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antar pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap jumlah sel yang mengekspresikan TLR4. Besar korelasi $R = -$

0.748 menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) yang diberikan, maka jumlah sel yang mengekspresikan TLR4 cenderung menurun.

5.2.3 Hasil Pengujian Apoptosis menggunakan Metode TUNEL Assay

5.2.3.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Data apoptosis sel MCF-7 dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan juga diuji homogenitasnya. Hasil uji menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dengan nilai $p > 0.05$ dan hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa data homogen dengan nilai $p = 0.102$ ($p > 0.05$) (Lampiran 8).

5.2.3.2 Uji One-way ANOVA

Apabila data terbukti normal dan homogen, maka uji dilanjutkan dengan menggunakan uji *One-way ANOVA*. Hasil uji tersebut yaitu $p = 0.000$ ($p < 0.05$) (Lampiran 8), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan nilai indeks apoptosis kelompok perlakuan kontrol dengan kelompok perlakuan dosis.

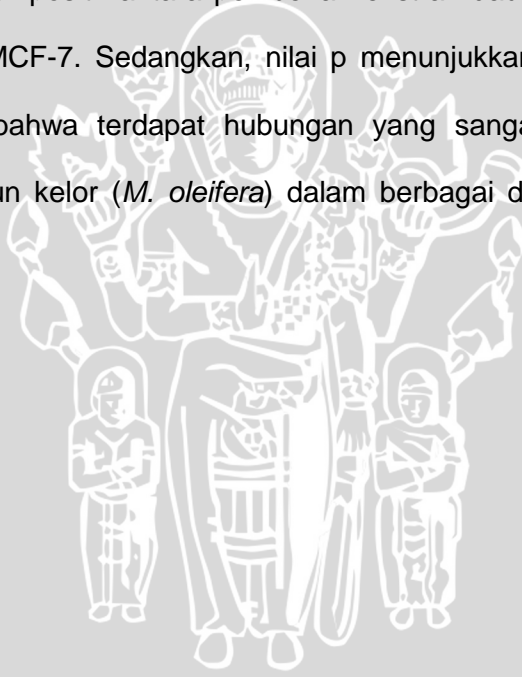
5.2.3.3 Uji Post Hoc

Untuk mengetahui dosis manakah yang memiliki perbedaan paling signifikan, maka dilakukan uji post hoc. Berdasarkan hasil uji, terdapat perbedaan yang signifikan terdapat pada seluruh antar kelompok perlakuan terhadap indeks

apoptosis. Hal itu ditunjukkan dengan nilai masing-masing perbandingan antar perlakuan adalah $p < 0.05$ (Lampiran 8).

5.2.3.4 Uji Pearson

Untuk mengetahui korelasi antara pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap indeks apoptosis pada sel MCF-7, maka dilakukan uji pearson. 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 p 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 8).



BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Analisis Hasil

6.1.1 Uji Fitokimia

Ekstrak daun kelor diperoleh melalui proses ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Digunakan pelarut etanol karena senyawa dalam daun kelor (*Moringa oleifera*) yang diduga sebagai antikanker merupakan senyawa polar yang kelarutannya tinggi dalam air maupun etanol. Namun, berdasarkan penelitian yang sudah ada, kandungan flavonoid yang diperoleh dengan proses ekstraksi dengan pelarut etanol 70% lebih tinggi dibandingkan dengan yang menggunakan pelarut air. Selain itu, senyawa flavonoid merupakan senyawa yang tidak tahan panas, sehingga digunakan metode ekstraksi dingin yaitu maserasi.

Pada penelitian ini, tidak hanya senyawa flavonoid saja yang diuji, namun senyawa-senyawa lain yang diduga dapat berperan menghambat pertumbuhan sel kanker MCF-7 yaitu tanin, alkaloid, fenol, saonin dan terpenoid. Senyawa kimia seperti tanin, fenol, dan terpenoid diketahui memiliki efek antikanker yaitu sebagai antioksidan. Senyawa fenol diketahui memiliki efek antioksidan yang hampir sama dengan vitamin C dan flavonoid quersetin. Antioksidan dapat mengeliminasi radikal bebas dan mengurangi stress oksidatif yang berperan penting dalam perkembangan kanker. Berdasarkan penelitian sebelumnya, tanin yang terkandung didalam ekstrak buah berry (strawberry, blueberry, raspberry) dapat menghambat pertumbuhan kanker kolon (HT-29, CT-116), kanker prostat, kanker kolon (HT-29, CT-116), kanker

prostat (LNCap, DU-145), kanker payudara (MCF-7) dan juga kanker mulut (KB, CAL-27) secara *in vitro*. Terpenoid itu sendiri selain memiliki efek antioksidan, juga diketahui memiliki efek antiinflamasi dan antitumor. Terpenoid triterpen yang terkandung dalam *Ganoderma lucidum* menginduksi apoptosis pada sel kanker manusia melalui jalur intrinsik mitokondria. Seperti halnya flavonoid, tanin, fenol, dan terpenoid juga merupakan senyawa kimia yang mudah terdegradasi oleh suhu yang tinggi, sehingga proses ekstraksinya menggunakan metode ekstraksi dingin yaitu maserasi (Dai, 2010 ; Cordero, 2012 ; Kao, 2013).

Pada ekstrak daun kelor juga diteliti kandungan alkaloid. Alkaloid merupakan senyawa kimia yang telah banyak diteliti efek antikankernya dan sudah banyak digunakan. Misalkan saja pada tanaman vinca, diketahui bahwa kandungan vinblastin dan vinkristin dapat menghambat proliferasi sel dengan efeknya pada mikrotubular dinamik selama proses mitosis dan menyebabkan apoptosis. Kombinasi senyawa analog semi-sintetis dari vinblastine dan vinkristin dengan obat kemoterapi lain menunjukkan efek potensial sebagai terapi leukemia, limfoma, kanker payudara, kanker paru-paru, dan *Kaposi's sarcoma*. Selain itu, ada juga alkaloid taxol yang diisolasi dari tanaman *Taxus brevifolia*. Senyawa tersebut diketahui dapat menghambat kanker ovarium, kanker payudara, kanker paru-paru, dan kanker prostat dengan mekanisme kerja yaitu senyawa aktif akan berikatan dengan mikrotubulus-mikrotubulus yang terpolimerisasi sehingga mencegah terjadinya mitosis (Nirmala, 2011). Alkaloid merupakan senyawa yang umumnya bersifat basa, sehingga mudah terdekomposisi oleh suhu yang tinggi dan juga oksigen. Alkaloid

diketahui mudah larut dalam air, alkohol/etanol, aseton dan kloroform, namun sedikit larut dalam ether, benzena dan petroleum eter (Hartati, 2010).

Pada membrane sel kanker, terdapat komponen tipe kolesterol dengan jumlah yang banyak, dibandingkan dengan sel yang normal. Saponin mengandung senyawa deterjen dan surfaktan karena senyawa tersebut memiliki subunit yang larut dalam air dan larut dalam lemak (sapogenin). Sebagai antikanker, senyawa yang terkandung dalam saponin yang dapat berikatan dengan kolesterol (*cholesterol-binding*) akan mengganggu pertumbuhan sel kanker dengan cara berikatan dengan membrane sel kanker tersebut sehingga mampu menghambat pertumbuhan bahkan menyebabkan kematian sel kanker, namun tidak mempengaruhi sel normal. Selain itu, saponin memiliki efek sebagai antioksidan, sehingga dapat menghambat kanker yang disebabkan oleh radikal bebas. Menurut penelitian, kandungan saponin dalam kacang kedelai (soyasaponin I) menunjukkan aktivitas estrogenik dengan cara bertindak sebagai antagonis estrogen dan sapogenol aglikon menunjukkan aktivitas antiproliferasi pada sel MCF-7 (Harlev *et al.*, 2012).

Menurut Manguro and Lemmen (2007), komponen spesifik flavanoid pada daun kelor (*Moringa oleifera*) yang bersifat antikanker yaitu jenis flavonoid glikosida *4-(α -L-rhamnopyranosyloxy) benzyl glukosinolate*, *4-(α -L-rhamnopyranosyloxy) benzyl isothiocyanate*, *benzyl isothiocyanate*, *niamisin (thiocarbamates)*, *quercetin-3-O-glukoside* dan *kaempferol-3-O-glikoside*. Quercetin merupakan flavonoid dalam ekstrak daun kelor yang dapat menghambat ekspresi TLR4 dan menghambat translokasi NF- κ B ke inti sel pada *peripheral blood mononuclear cells* manusia,

sehingga tidak terjadi pelepasan sitokin proinflamasi (Bhaskar, 2011). Flavonoid quercetin dalam ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) sebelumnya juga telah diteliti sebagai antikanker dengan mekanisme hambatan pada ekspresi IGF-1 pada hepar (Moekoe, 2012).

Dari hasil uji fitokimia, daun kelor (*Moringa oleifera*) diketahui mengandung senyawa kimia flavonoid, alkaloid, fenol, tannin, saponin. Pada penelitian sebelumnya, disebutkan kandungan fitokimia daun kelor (*Moringa oleifera*) terbanyak yaitu tannin, fenol, saponin, dan flavonoid, serta mengandung sedikit terpenoid dan alkaloid (Mustafa, 2011 ; Anwar, 2007 ; Krishnaiah, 2009). Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) setelah diuji kualitatif, ternyata tidak mengandung terpenoid. Hal ini mungkin dikarenakan adanya perbedaan metode ekstraksi yang dilakukan. Penelitian yang dilakukan oleh Krishnaiah (2009), proses ekstraksi dilakukan dengan metode ekstraksi panas yaitu infusa, sedangkan penelitian ini menggunakan metode ekstraksi dingin yaitu maserasi, sehingga kandungan terpenoid dalam ekstrak tidak dapat keluar.

6.1.2 Uji Penentuan IC₅₀ (MTT Assay)

Penelitian eksperimental ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh berbagai dosis ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan persen hambatan proliferasi sel kanker payudara MCF-7 secara *in vitro*. MTT Assay dilakukan untuk mengetahui dosis yang memiliki aktivitas hambatan proliferasi terhadap sel MCF-7 sebanyak 50% (1x IC₅₀).

Prinsip dasar MTT Assay adalah pengukuran kemampuan sel hidup berdasarkan aktivitas *succinic dehydrogenase* mitokondria pada kultur sel. Pada sel yang hidup, proses metabolisme menghasilkan enzim *succinic dehydrogenase* mitokondria. Enzim ini akan bereaksi dengan garam *methylthiazol tetrazolium* (MTT) dan akan membentuk kristal formazan berwarna ungu. Warna ungu yang muncul tersebut sebanding dengan aktivitas sel yang hidup. Nilai absorbansi kristal formazan diukur dengan ELISA Reader dengan panjang gelombang 550-570 nm (Meizarini, 2005).

Berdasarkan penelitian yang sudah ada, dosis $1 \times IC_{50}$ ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) yang optimal menghambat proliferasi sel kanker kolon yaitu berada dalam rentang kurang dari 300 $\mu\text{g/ml}$ (Pamok *et al.*, 2012). Sehingga ditentukan dosis yang tidak jauh dari dosis dibawah 300 $\mu\text{g/ml}$, yaitu dosis seri 7.8125 $\mu\text{g/ml}$, 15.625 $\mu\text{g/ml}$, 31.25 $\mu\text{g/ml}$, 62.5 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ 1000 $\mu\text{g/ml}$, serta dosis kelipatan 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$, 350 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$, 450 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 550 $\mu\text{g/ml}$, 600 $\mu\text{g/ml}$, 650 $\mu\text{g/ml}$, dan 700 $\mu\text{g/ml}$. Setelah dilakukan uji MTT Assay, belum ditemukan dosis yang mendekati IC_{50} atau dosis yang dapat menyebabkan kematian sel MCF-7 sebanyak 50%. Pada uji MTT pertama, belum ditemukan dosis yang mendekati IC_{50} (Lampiran 10) mungkin dikarenakan adanya perbedaan sel yang digunakan yaitu sel kanker kolon pada penelitian sebelumnya, sedangkan penelitian ini menggunakan sel kanker payudara MCF-7, sehingga efektivitas kerja ekstrak pun berbeda.

Oleh karena itu, dilakukan optimasi dosis kedua untuk menentukan dosis IC_{50} yang diinginkan dengan rentang dosis lebih besar dibandingkan dengan dosis pada MTT pertama. Dosis yang digunakan pada MTT kedua ini yaitu dosis seri 1250 $\mu\text{g/ml}$, 5000 $\mu\text{g/ml}$, 5800 $\mu\text{g/ml}$, 6000 $\mu\text{g/ml}$, 6200 $\mu\text{g/ml}$, 10000 $\mu\text{g/ml}$, 20000 $\mu\text{g/ml}$, serta dosis kelipatan 1200 $\mu\text{g/ml}$, 1400 $\mu\text{g/ml}$, 1600 $\mu\text{g/ml}$, 1800 $\mu\text{g/ml}$, 2000 $\mu\text{g/ml}$, 2200 $\mu\text{g/ml}$, 2400 $\mu\text{g/ml}$, 2600 $\mu\text{g/ml}$, 2800 $\mu\text{g/ml}$, 3000 $\mu\text{g/ml}$, 3200 $\mu\text{g/ml}$, 3400 $\mu\text{g/ml}$, 3600 $\mu\text{g/ml}$, 3800 $\mu\text{g/ml}$, 4000 $\mu\text{g/ml}$, 4200 $\mu\text{g/ml}$, 4400 $\mu\text{g/ml}$, 4600 $\mu\text{g/ml}$, 4800 $\mu\text{g/ml}$, 5000 $\mu\text{g/ml}$, 5200 $\mu\text{g/ml}$, 5400 $\mu\text{g/ml}$, dan 5600 $\mu\text{g/ml}$. Setelah dilakukan MTT Assay, diperoleh absorbansinya, kemudian bisa dihitung persen (%) hambatan proliferasi sel MCF-7. Hasil persen (%) hambatan proliferasi tersebut dimasukkan kedalam persamaan regresi kurva yang telah dibuat dan didapat dosis IC_{50} sebesar 2200 $\mu\text{g/ml}$.

6.1.3 Pengaruh Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) dan Ekspresi TLR4

TLR4 merupakan protein transmembran yang akan menimbulkan respon inflamasi sebagai mekanisme tubuh untuk menjaga keseimbangan tubuh agar tetap pada kondisi normal saat ada senyawa-senyawa pathogen (PAMP) yang masuk, ataupun akibat kerusakan jaringan oleh kanker. Salah satu PAMP yang dapat menyebabkan peningkatan ekspresi TLR4 adalah *heat-shock protein 70* (Hsp 70). Inflamasi akibat aktivasi TLR pada sel kanker tersebut akan meningkatkan progresifitas kanker dan juga menghambat apoptosis (Sato *et al.*, 2009). Adanya stimulus yaitu Hsp70 yang berikatan dengan TLR4 memicu penggabungan TLR4 dengan protein adaptor *myeloid differentiation primary respons protein 88* (MYD88)

sehingga selanjutnya akan memediasi proliferasi sel, respon inflamasi, serta menghambat pelepasan sitokrom c sehingga tidak akan terjadi apoptosis sel. Oleh karena itu, dalam kondisi kanker, sel akan mengekspresikan TLR4 yang tinggi dan dapat menghambat proses apoptosis. Demaria (2011) menyebutkan, TLR4 terekspresi sekitar 90% pada *cell-line* kanker payudara MDA-MB-231. Pada penelitian ini, dosis ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) yang digunakan yaitu $\frac{1}{2}$ x IC50, IC50, dan 2x IC50 serta kontrol negatif dengan 6 kali pengulangan. Dosis tersebut diperoleh dari optimasi dosis MTT kedua. Ekspresi TLR4 ditunjukkan dengan warna coklat yang terdapat pada inti sel, membran sel, dan sitoplasma. Menurut Janardhan (2006), TLR4 banyak terekspresi di membran sel dan sitoplasma, namun juga diketahui terjadi lokalisasi TLR4 di inti sel pada sel paru-paru yang mengalami inflamasi. Oleh karena itu, pengamatan ekspresi TLR4 pada penelitian ini dilakukan pada inti membrane sel, sitoplasma, maupun inti sel yang berwarna coklat. Selanjutnya, jumlah inti sel, membran sel, maupun sitoplasma yang mengekspresikan TLR4 dibandingkan dengan total sel keseluruhan dalam 10 lapang pandang sehingga didapatkan indeks ekspresi TLR4 pada sel MCF-7. Dari hasil indeks tersebut kemudian dianalisis dengan Kruskal Wallis, sehingga diketahui terdapat perbedaan yang signifikan dari tiap dosis.

Eksrak daun kelor (*Moringa oleifera*) menunjukkan hasil positif dalam menurunkan ekspresi TLR4. Dosis 1100 μ g/ml, 2200 μ g/ml, dan 4400 μ g/ml terbukti secara signifikan menurunkan ekspresi TLR4 pada sel kanker payudara MCF-7 apabila dibandingkan dengan kontrol setelah dipaparkan selama 24 jam. Dosis yang digunakan jauh lebih tinggi dibandingkan dosis dari pustaka sebelumnya,

dikarenakan sel kanker yang digunakan juga berbeda. Pada dosis 1100 µg/ml, sebenarnya sudah terlihat bahwa ada penurunan ekspresi TLR4, namun tidak signifikan. Sedangkan, dosis optimum yang dapat menurunkan ekspresi TLR4 secara signifikan yaitu dosis 2200 µg/ml. Peningkatan dosis menjadi 6600 µg/ml menyebabkan penurunan ekspresi TLR4 pada sel MCF-7 dibandingkan kontrol sel, namun ada peningkatan ekspresi TLR4 apabila dibandingkan dengan dosis 2200 µg/ml, namun tidak terlalu signifikan (Lampiran 16).

6.1.4 Pengaruh Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) dan Apoptosis Sel MCF-7

Apoptosis merupakan proses kematian sel yang terjadi secara terprogram ditandai dengan gambaran morfologi dan biokimiawi khas tanpa menimbulkan reaksi inflamasi. Untuk menguji apoptosis yang terjadi pada sel, dilakukan metode TUNEL Assay. Prinsip kerja dari metode tersebut yaitu dengan mendeteksi fragmentasi DNA pada rantai tunggal maupun ganda yang disebabkan oleh aktifitas endonuclease endogen selama proses apoptosis.

Berdasarkan hasil uji TUNEL Assay, sel yang dipaparkan dengan dosis 4400 µg/ml menunjukkan warna yang jauh lebih coklat apabila dibandingkan dengan kontrol. Sel yang dipaparkan dosis 2200 µg/ml menunjukkan warna coklat yang lebih pudar dibanding dengan dosis 4400 µg/ml. Sedangkan sel yang dipaparkan dosis 1100 µg/ml menunjukkan warna coklat yang lebih pudar dibandingkan sel yang dipaparkan dengan dosis 2200 µg/ml. Namun, hasil ini tidak dapat dikatakan berhasil menentukan hubungan antara efek ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*)

terhadap peningkatan apoptosis sel MCF-7. Hal tersebut dikarenakan dalam pengamatan ini hanya dilakukan dalam dua lapang pandang saja dengan pengulangan sebanyak 6 kali, sedangkan batas lapang pandang minimal untuk mengamati hasil adalah 10 lapang pandang. Pengamatan hanya dilakukan dalam dua lapang pandang karena setelah diamati pada slide, banyak sekali sel yang diduga telah mengalami nekrosis dan mungkin terjadi karena kesalahan perlakuan yang dilakukan oleh peneliti sehingga hasilnya dikatakan tidak representatif dan perlu dilakukan uji apoptosis ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap apoptosis sel MCF-7 kembali.

6.2 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini memiliki keterbatasan yaitu pengujian fitokimia senyawa flavonoid masih dilakukan secara kualitatif (belum menggunakan standart flavonoid). Penelitian ini juga masih dilakukan secara *in vitro* pada sel MCF-7, sehingga masih harus dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat keamanan dan toksisitas ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) secara *in vivo* pada hewan coba. Selain itu, tidak disertakan obat konvensional antikanker sebagai *gold standart* juga merupakan keterbatasan dari penelitian ini.

BAB 7

KESIMPULAN

7.1 Kesimpulan

- 1) Nilai IC_{50} ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) yaitu 2200 $\mu\text{g/ml}$.
- 2) Semakin tinggi dosis ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) yang dipaparkan pada sel MCF-7, semakin rendah jumlah sel yang mengekspresikan TLR4.
- 3) Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) cenderung meningkatkan apoptosis sel MCF-7.

7.2 Saran

- 1) Pengamatan mikroskopik disarankan menggunakan mikroskop fluoresen.
- 2) Perlu dilakukan uji kuantitatif flavonoid dalam ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan menggunakan standart flavonoid.
- 3) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menambahkan perlakuan kontrol positif, yaitu kelompok perlakuan yang diberikan terapi konvensional doxorubisin sebagai *gold standart* terapi kanker payudara agar fapat dibandingkan potensi daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan doxorubisin.
- 4) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap ekspresi *Toll-like receptor 4* (TLR4) dan apoptosis sel MCF-7 *in vivo* (pada hewan coba) untuk mengetahui keamanan, dan toksisitas penggunaannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, J.M and Suzanne C. 1998. *The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival*. Institute of Medical Research, Post Office Royal Melbourne Hospital, Victoria 3050, Australia.
- Adityo, S. 2008. *Gemcitabine Sebagai Induktor Apoptosis pada Sel Kanker Pankreas*. Kajian Farmakologi Molekuler.
- Aghdassi, A., Phillips, P., et all. 2006. *Heat Shock Protein 70 Increases Tumorigenicity and Inhibits Apoptosis in Pancreatic Adenocarcinoma*. 67(2): 616-25. The Journal of Cancer Research. Department of Gastroenterology, Endocrinology, and Nutrition, Ernst-Moritz-Arndt Universität, Greifswald. Germany.
- American Cancer Society Facts and Figures . 2013. Corporate Center: American Cancer Society Inc. Atlanta.
- American Cancer Society. 2012. *Breast Cancer Facts*. Corporate Center: American Cancer Society Inc. Atlanta.
- Anwar, F., Said, L., Ashraf, M., dan Gilani, A.H. 2007. *Moringa oleifera: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses*, *Phytotherapy Research*, 21: 17-25
- Asea, A, Michael R, Edith K, Jason A.B, Olivia B, et al., 2002. *The Journal Of Biological Chemistry* 277: 15028-15034. Mechanisms Of Signal Transduction: Novel Signal Transduction Pathway Utilized by Extracellular HSP70: Role of Toll-Like Receptor (TLR) 2 And TLR4.
- Balachandran, Premalatha and Rajgopal Govindarajan. 2005. *Cancer—An Ayurvedic Perspective*. *Pharmacological Research* 51 19–30. Omaha :

Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Nebraska Medical Center.

Bhaskar, S, Shalini, V, Helen, A. 2011. *Immunobiology* 216 p367–373. Quercetin Regulates Oxidized LDL Induced Inflammatory Changes in Human Pbmcs by Modulating the TLR-NF-kB Signaling Pathway. India : Department of Biochemistry, University of Kerala, Thiruvananthapuram, Kerala.

Blasius, A.L. and Bruce Beutler. 2010. *Immunity Review : Intracellular Toll-like Receptors*. Elsevier Inc.

Cecconi, F., Marcello D'Amelio. 2010. *Apoptosome An up-and-coming Therapeutical Tool*. London: Springer Science and Business Media B.V.

Cordero C.M, González, A.J.L, Montañó, J.M.C, Morón, E.B, Lázaro, M.L. 2012. *Current Drug Targets* p1006-1028. Pro-Oxidant Natural Products as Anticancer Agents. Span: Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Seville.

Dai, J, and Russell J. Mumper. 2010. *Molecules* 15, p7313-7352. Review: Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. USA: Division of Molecular Pharmaceutics, UNC Eshelman School of Pharmacy, University of North Carolina at Chapel Hill.

Demaria,S, Karsten A.P, Sylvia A. 2011. *Cross-Talk of Breast Cancer Cells with the Immune System Breast Cancer - Carcinogenesis, Cell Growth and Signalling Pathways*. New York : New York University School of Medicine and NYU Langone Medical Center.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2006. *Pedoman Nasional Pengendalian Penyakit Kanker*. Jakarta : Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan.

Desen, W. 2008. *Onkologi Klinis*. Edisi 2. Jakarta: FKUI.

Dipiro, J.T, Robert L.T, Gary C.Y, Gary R.M, Barbara G.W, L. Michael Posey. 2008. *Pharmacotherapy: A Pathophysiology Approach 7th Edition* pages 2119. New York : McGraw Hill Company.

Fan, H, Litao L, Xiangjian Z, et al,. 2009. *Journal Mediators of Inflammation Volume 2009*. Oxymatrine Downregulates TLR4, TLR2, MyD88, and NF-B and Protects Rat Brains against Focal Ischemia. China : Department of Neurology, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang.

Fukata M, Chen A, Vamadevan AS, Cohen J, Breglio K, Krishnareddy S, et al. 2007. Toll-like Receptor 4 Promotes The Development of Colitis-Associated Colorectal Tumors. *Gastroenterology* ; 133 : 1869-81.

Hardyanto, J, Pratiwi T, Djoko W. 2012. *Efek Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air (Marsilea Crenata) Terhadap Penurunan Kadar Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) Dan Interleukin 1 Beta (IL-1 β) Pada Tikus Putih (Rattus Norvegicus) Urolithiasis* . Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Universitas Brawijaya.

Harlev, E, Nevo, E, Lansky, E.P, Lansky, S, Bishayee, A. 2012. *Anti-Cancer Drugs Vol. 23 No 3*. Anticancer attributes of Desert Plants: A Review.

Hartati, I. 2010. *Isolasi Alkaloid dari Tepung Gadung (Dioscorea Hispida Dennst) dengan Teknik Ekstraksi Berbantu Gelombang Mikro*. Semarang: Universitas Diponegoro.

Huang B, Zhao J, Unkeless JC, Feng ZH, Xiong H. TLR Signaling by Tumor and Immune Cells : A Double-Edged Sword. *Oncogene* ; 27 : 218-24.

Indarto, M.D. 2013. *Aktivitas Enzim Transaminase dan Gambaran Histopatologi Hati Tikus (Rattus Norvegicus) Wistar Jantan yang Diberi Fraksi N-Heksan*

Daun Kesum (Polygonum Minus Huds.) Pasca Induksi Sisplatin. Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura Pontianak.

Janardhan, K.S, Mclsaac, M, Fowlie, J, Shrivastav, A, Caldwell, S, Sharma, R.K., Singh, B. 2006. *Histol Histopathol 21: 687-696. Toll Like Receptor-4 Expression in Lipopolysaccharide Induced Lung Inflammation.* Canada : Department of Pathology, Cancer Research Unit.

Jonny, M.S, M. Sitorus, Nelly K. 2008. *Cegah Malnutrisi dengan Kelor.* Penerbit Kanisius.

Kao Chi H.J., Amalini C. J., Karen S. B., Marcus P. G., Lynnette R.F. 2013. *Functional Foods in Health and Disease. 3(2):48-65. Anti-Cancer Activities of Ganoderma lucidum: Active Ingredients and Pathways.*

Kelly, M.G, Ayesha B. A, Rui C, Dan A, Vikki M. A, Serena C, Irene V, Thomas R, Gil M. 2006. *TLR-4 Signaling Promotes Tumor Growth and Paclitaxel Chemoresistance in Ovarian Cancer.* Department of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Sciences, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut.

Kumala, P, Komala S, Santoso AH, Sulaiman JR, Rienita. 2010. *Kamus Saku Kedokteran Dorland. 28th ed.* Jakarta: EGC.

Krishnaiah D , Devi T, Bono A, Sarbatly R. 2009. *Journal of Medicinal Plants Research Vol. 3(2), pp. 067-072.* Malaysia : Studies on Phytochemical Constituents of Six Malaysian Medicinal Plants. Chemical Engineering Program, School of Engineering and Information Technology, University of Malaysia Sabah.

Liu, Z dan Jiahuai Han. 2001. *Curr. Issues Mol. Biol. 3(4): 79-90.* Cellular Responses to Tumor Necrosis Factor. Caister Academic Press.

- Liang Y, Yan C, Schor N.F. 2001. *Oncogene* 20 p6570 – 6578. Apoptosis in the absence of caspase 3. Pennsylvania USA.
- Luwia, M. 2009. *Problematika dan Keperawatan Payudara*. Jakarta: Kawan Pustaka.
- Maat, S. 2009. *Toll like receptor*. Surabaya: Airlangga University Press, hlm.4-30.
- Martinou, J.C and Richard J.Y. 2011. Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 Family Members and Mitochondrial Dynamics. *Developmental Cell Volume 21, Issue 1, , Pages 92–101*. Department of Cell Biology, University of Geneva, Switzerland.
- Manguro and Lemmen. 2007. Phenolics of *Moringa oleifera* Leaves. *Natural Product Research, Volume 21, Issue 1 January 2007 , pages 56 – 68*.
- Medvedev, A.E, Karen M. Kopydlowski, and Stefanie N. V. 2000. *The Journal of Immunology* 164:5564-5574. Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Signal Transduction in Endotoxin-Tolerized Mouse Macrophages: Dysregulation of Cytokine, Chemokine, and Toll-Like Receptor 2 and 4 Gene Expression.
- Meizarini A. 2005. *Majalah Kedokteran Gigi (Dental Journal)* ; 38(1):20–24. Sitotoksisitas Bahan Restorasi Cyanoacrylate Pada Variasi Perbandingan Powder Dan Liquid Menggunakan MTT Assay.
- Mooney LM, Sakkaf KA, Brown BL, Dobson PRM. 2002. *British Journal of Cancer* 87, 909 – 917. Apoptotic Mechanisms in T47D and MCF-7 Human Breast Cancer Cells. Cancer Research UK.
- Murphy, K. 2012. *The induced responses of innate immunity, 8th ed p85-91*. Garland Science, Taylor & Francis Group. New York : USA.

Mustafa, J. 2003. *Kajian Toksikopatologi Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kelor (Moringa oleifera Lamk) pada Mencit (Mus Musculus)*. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.

Moekoe, Andreas N. 2012. *Efek Ekstrak Methanol Daun Kelor (Moringa oleifera) terhadap Ekspresi IGF-1 pada Jaringan Hepar Tikus Wistar (Rattus norvegicus) Model Hepatocarcinoma yang Diinduksi 7,12 Dimethylbenz[A]Anthracene (DMBA)*. Malang : Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Nadhiroh, A.M. 2011. Faktor-Faktor yang Berhubungan dengan Perilaku Mahasiswa D-IV Kebidanan tentang Deteksi Dini Kanker Payudara Melalui Pemeriksaan Payudara Sendiri (Sadari) di Stikes Insan Unggul Surabaya. *Jurnal Insan Kesehatan, Stikes Insane Se Agung Bangkalan Vol. 3 No. 2*.

Nazir, M. 2004. *Metode Penelitian*. Jakarta : Ghalia Indonesia.

Nicolier, M, Anne-Zélie D.B, Sophie L, Jean-L.P , Christiane M. 2009. Spatio Temporal Activation of Caspase-Dependent and –Independent Pathways in Staurosporine-Induced Apoptosis of p53^{wt} and p53^{mt} Human Cervical Carcinoma Cells. *Biol. Cell* 101, 455–467.

Nirmala, M.J, Samundeeswari ,A. Sankar, D. 2011. Research in Plant Biology, 1(3): 01-14 *Mini-Review : Natural Plant Resources in Anti- Cancer Therapy- A Review*. India: School of Bio Sciences and Technology

Nugrahaningtyas, K.D, Sabirin M, Tutik D.W. 2005. *Biofarmasi* 3 (1): 32-38. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dalam Rimpang Temu Ireng (Curcuma aeruginosa Roxb.). Surakarta : Biologi FMIPA UNS.

Ola, M.S, Mohd. N, Haseeb A. 2011. *Molecular and Cellular Biochemistry* , Volume 351, Issue 1-2, pages 41-58. Role of Bcl-2 Family Proteins and

Caspases in The Regulation of Apoptosis. Department of Ophthalmology, College of Medicine, King Saud University, Riyadh.

Parvathy MVS dan Umamaheshwari A. 2007. Cytotoxic Effect of *Moringa oleifera* Leaf Extracts in Human Multiple Myeloma Cell Lines. *Trends in Medical Research*, 2 (1) : 44-50.

Pamok, S, Supap S, Usanee V, Kanokporn S. 2012. *Journal of Medicinal Plants Research Vol. 6(1), pp. 139-145*. Antiproliferative Effect of *Moringa oleifera* Lam. And *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk Extracts on The Colon Cancer Cells. Thailand : Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University.

Price and Wilson. 2006. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Volume 1. Edisi 6. Jakarta : EGC.

Prunet, C., Lemaire-ewing,S., Menetrier, F., Neel, D., dan Lizard, G. 2005. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 19 (5) : 311-326. Activation of Caspase-3-Dependent and Independent Pathways During 7-Ketocholesterol and 7 β -Hidroxycholesterol-Induced Cell Death : A Morphological and Biochemical Study. Rastogi R, Richa, Rajeshwar P Sinha. 2009. Apoptosis: Molecular Mechanisms and Pathogenicity. *EXCLI Journal* 8: 155-181.

Redha, A. 2010. *Jurnal Belian Vol. 9 No. 2 p196 – 202*. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya Dalam Sistem Biologis. Jurusan Teknologi Pertanian Politeknik Negeri Pontianak

Ren, W, Zhenhua Q, Hongwei W, Lei Z, Li Z. 2003. *Medicinal Research Reviews*, Vol. 23, No. 4, page 519- 534. Flavonoids: Promising Anticancer Agents. Wiley Periodicals,Inc.

Ridnour, et al. 2012. *Molecular Pathways: Toll-like Receptors in the Tumor Microenvironment - Poor Prognosis or New Therapeutic Opportunity.*

Radiation Biology Branch, National Cancer Institute.

Rohyami, Yulli. 2008. *Penentuan Kandungan Flavonoid Dari Ekstrak Metanol*

Daging Buah Mahkota Dewa. Jurnal Penelitian dan Pengabdian. Program DIII Kimia Analis FMIPA UII. Yogyakarta.

Rieckher, M and Nektarios T. 2010. *Caspase-Independent Cell Death*

Mechanisms in Simple Animal Models. Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology, Greece.

Saputra, H. 2012. *Efek Pemberian Ekstrak Methanol Daun Kelor (Moringa*

Oleifera) terhadap Ekspresi TRAIL R1 (Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor 1) Jaringan Hepar Tikus Wistar Model Kanker Hepar yang Diinduksi 7,12 Dimethylbenz A Anthracene (Dmba). Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Sato, Y, Yasufumi G, Norihiko N, Dave S.B. Hoon. 2009. *Cancer Cells*

Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. Department of Molecular Oncology, John Wayne Cancer Institute at Saint John's Health Center.

Setiawan V.W., Monroe K.R., Wilkens L.R., Kolonel L.N., Malcolm C.P.,

Henderson B.E. 2009. *American Journal of Epidemiology*;169 (10):1251-1259. Breast Cancer Risk Factors Defined by Estrogen and Progesterone Receptor Status, the Multiethnic Cohort Study.

Szczepanski, M.J, Malgorzata C, Marta S, Malgorzata H, Michael B, Aleksandra

K, Witold S, Jan Z, Theresa L. W. 2009. *Cancer Res* 69: (7). Triggering of

Toll-like Receptor 4 Expressed on Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Promotes Tumor Development and Protects the Tumor from Immune Attack. University of Pittsburgh.

Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. 2003. Toll like receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 21, pp.335-76.

Wang, EI, ZR Qian, M Nakasono, T Tanahashi, *et al.* 2010. High Expression of Toll-Like Receptor 4/Myeloid Differentiation Factor 88 Signals Correlates with Poor Prognosis in Colorectal Cancer. *British Journal of Cancer* 102, 908–915 . Cancer Research UK.

Widowati, Ldan Harfla M. 2009. *Ujiaktivitas Ekstrak Etanol 50% Umbi Keladi Tikus (Typhoniumflagelliforme (Lood) Bi) Terhadap Sel Kanker Payudara Mcf-7 In Vitro.* Media Litbang Kesehatan Volume XIX Nomor 1.

Zampieri,L., Bianchi,P., Ruff,P., dan Arbuthnot, P. 2002. *Differential Modulation by Estradiol of P-glycoprotein Drug Resistance Protein Expression in Cultured MCF-7 and T47D Breast Cancer Cells.* *Anticancer Res.* 22(4) : 2253-9.

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

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Indah Lestari

NIM : 105070500111015

Program Studi : Farmasi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar merupakan hasil karya tulisan saya sendiri. Saya mengakui bahwa ide tulisan ini berdasarkan pada penelitian-penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh orang lain. Namun, saya menegaskan bahwa Tugas Akhir yang saya buat ini bukan merupakan hasil pengambilan semua gagasan orang lain. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 26 Juni 2014

Yang membuat pernyataan,

Indah Lestari

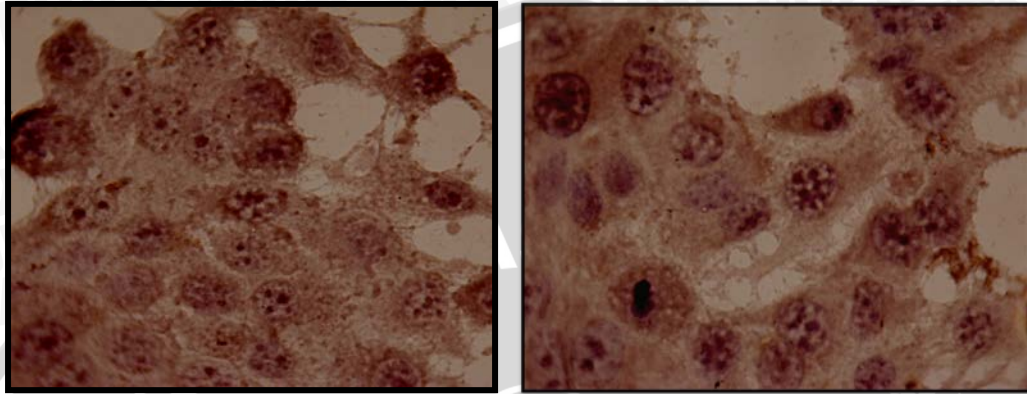
105070500111015

Lampiran 10. Data persentase IC₅₀ (MTT Assay 1)

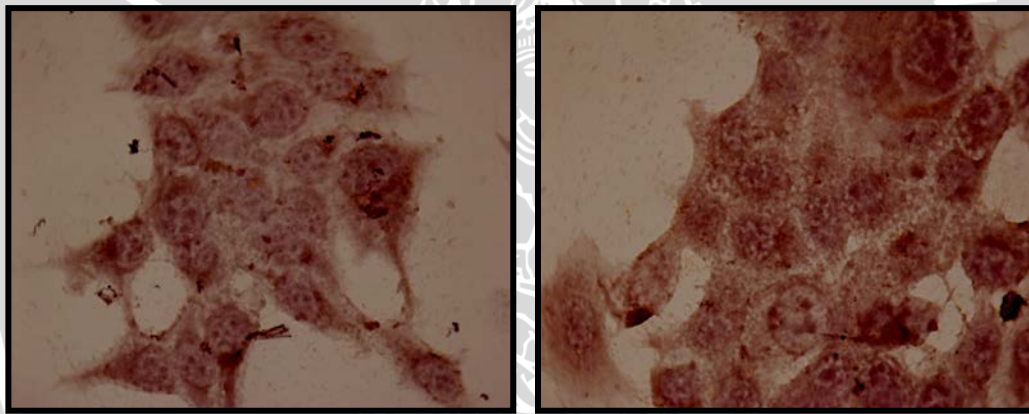
Dosis (µg/ml)	Kematian sel (%)
7,8125	34,93
15,625	32,60
31,25	31,92
50	15,34
62,5	35,20
100	14,62
125	31,50
150	16,71
200	21,30
250	21,85
300	24,11
350	21,03
400	22,47
450	20,82
500	21,51
550	22,74
600	29,59
650	30,00
700	29,32
1000	39,45

Lampiran 11. Hasil Foto Imunositokimia Ekspresi TLR4

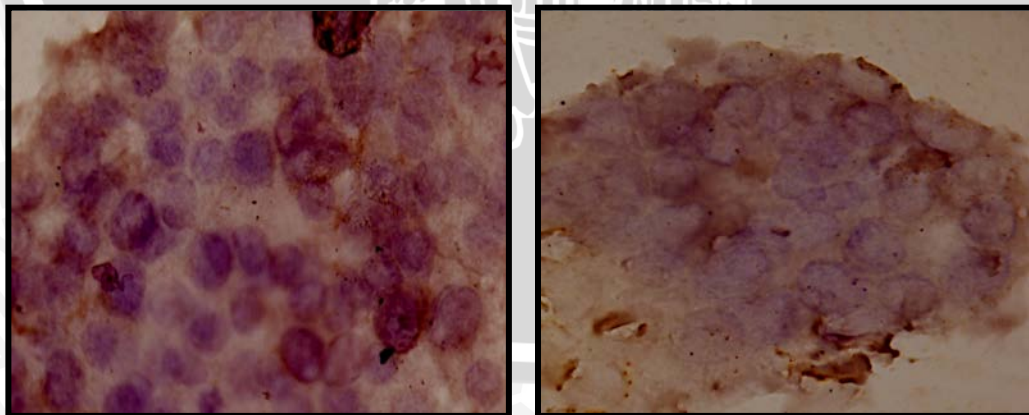
1) Kontrol



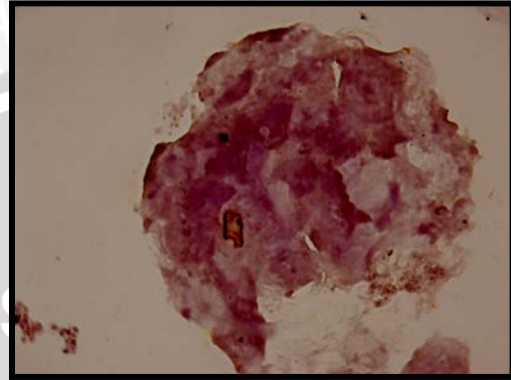
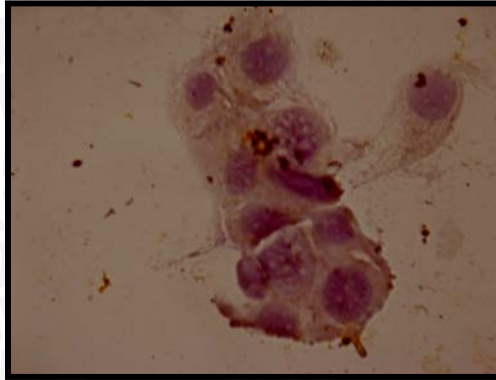
2) Dosis 1100 µg/ml



3) Dosis 2200 µg/ml



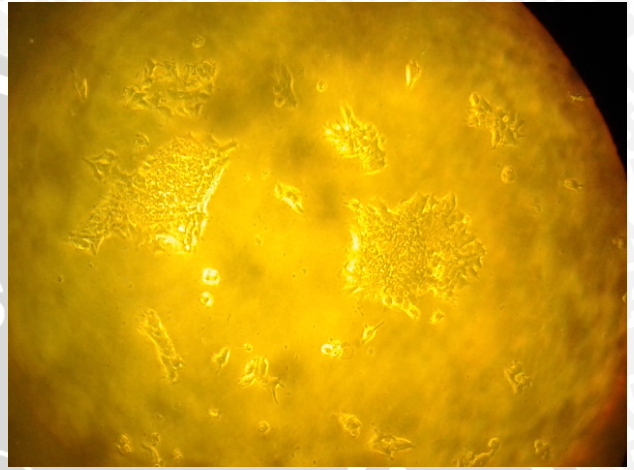
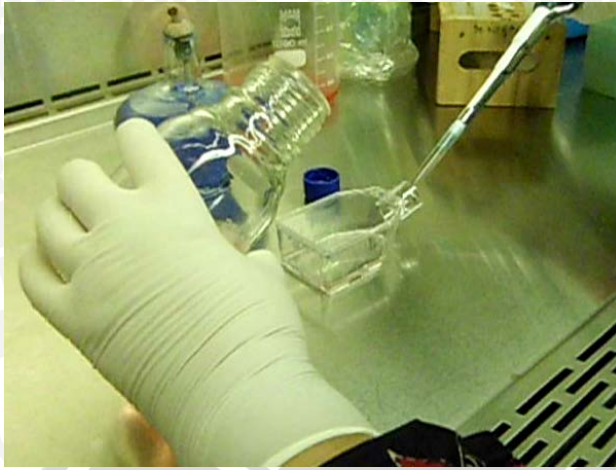
4) Dosis 4400 µg/ml



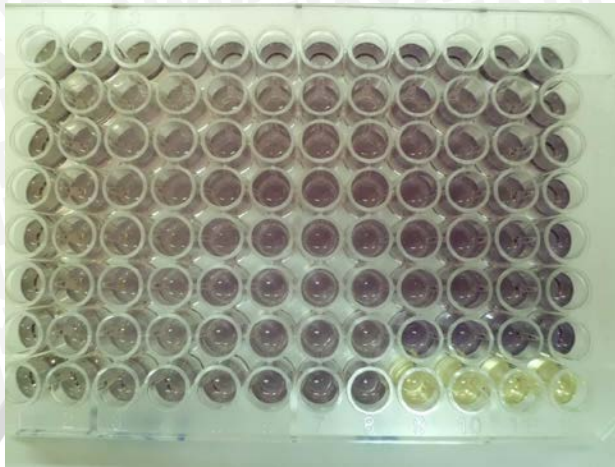
Lampiran 12. Foto Prosedur Ekstraksi Daun Kelor



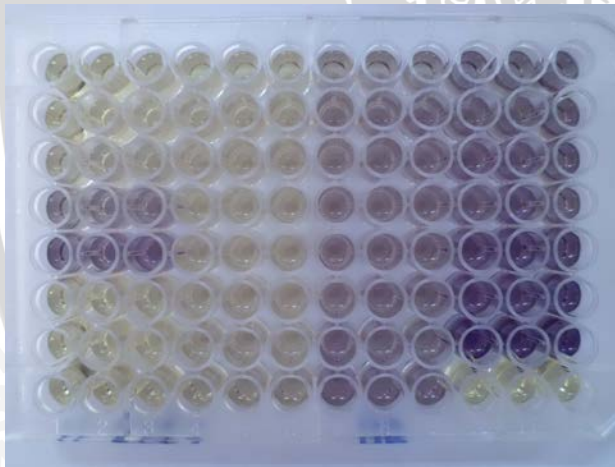
Lampiran 13. Foto Prosedur Kultur Sel



Lampiran 14. Foto sel dalam *well-plate* yang telah diberi MTT

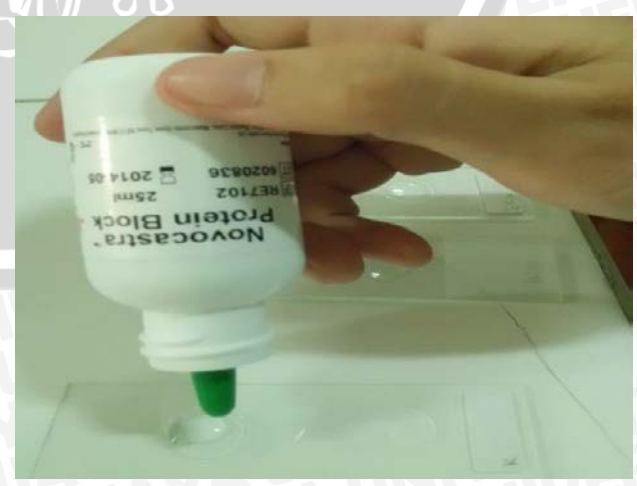
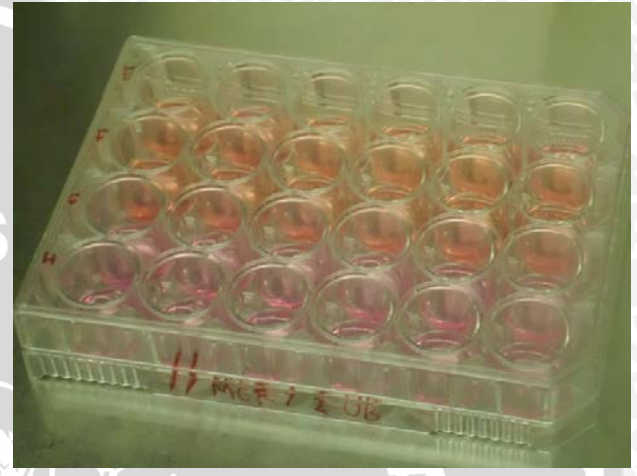
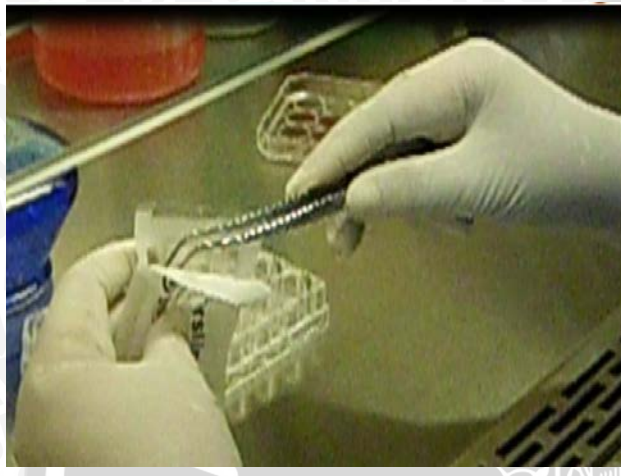


MTT 1



MTT 2

Lampiran 15. Foto Proses Pengujian Ekspresi TLR4 dengan Imunositokimia





Lampiran 16. Foto Prosedur Uji Apoptosis dengan TUNEL Assay



Lampiran 17. Data Pembagian Kelompok MTT Assay

Tabel 4.1 Pembagian Kelompok MTT 1

No	Kelompok	Perlakuan
1	Kontrol negatif	Sel MCF-7 tanpa pemberian terapi
2	Kontrol media	Sel MCF-7 berisi DMEM
3	I	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 1000 µg/ml
4	II	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 500 µg/ml
5	III	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 250 µg/ml
6	IV	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 125 µg/ml
7	V	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 62,5 µg/ml
8	VI	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 31,25 µg/ml
9	VII	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 15,625 µg/ml
10	VIII	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 7,8125 µg/ml
11	IX	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 700 µg/ml
12	X	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 650 µg/ml
13	XI	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 600 µg/ml
14	XII	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor

		dengan dosis 550 µg/ml
15	XIII	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 500 µg/ml
16	XIV	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 450 µg/ml
17	XV	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 400 µg/ml
18	XVI	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 350 µg/ml
19	XVII	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 300 µg/ml
20	XVIII	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 250 µg/ml
21	XIX	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 200 µg/ml
22	XX	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 150 µg/ml
23	XXI	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 100 µg/ml
24	XXII	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 50 µg/ml


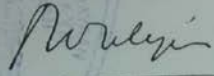
Tabel 4.2 Pembagian Kelompok MTT 2

No	Kelompok	Perlakuan
1	Kontrol negatif	Sel MCF-7 tanpa pemberian terapi
2	Kontrol media	Sel MCF-7 berisi DMEM
3	I	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 20.000 µg/ml
4	II	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor

		dengan dosis 10.000 µg/ml
5	III	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 5000 µg/ml
6	IV	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 2500 µg/ml
7	V	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 1250 µg/ml
8	VI	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 6200 µg/ml
9	VII	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 6000 µg/ml
10	VII	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 5800 µg/ml
11	IX	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 5600 µg/ml
12	X	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 5400 µg/ml
13	XI	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 5200 µg/ml
14	XII	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 4800 µg/ml
15	XII	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 4600 µg/ml
16	XIV	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 4400 µg/ml
17	XV	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 4200 µg/ml
18	XVI	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 4000 µg/ml
19	XVII	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor

		dengan dosis 3800 µg/ml
20	XVIII	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 3600 µg/ml
21	XIX	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 3400 µg/ml
22	XX	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 3200 µg/ml
23	XXI	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 3000 µg/ml
24	XXII	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 2800 µg/ml
25	XXIII	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 2600 µg/ml
26	XXIV	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 2400 µg/ml
27	XXV	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 2200 µg/ml
28	XXVI	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 2000 µg/ml
29	XXVII	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 1800 µg/ml
30	XXVIII	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 1600 µg/ml
31	XXIX	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 1400 µg/ml
32	XXX	Sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan dosis 1200 µg/ml

Lampiran 2. Keterangan Kelayakan Etik

	KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN THE MINISTRY OF EDUCATION AND CULTURE FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA FACULTY OF MEDICINE UNIVERSITY OF BRAWIJAYA KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE Jalan Veteran Malang – 65145 Telp./ Fax. (62) 341 - 553930
KETERANGAN KELAIKAN ETIK ("ETHICAL CLEARANCE")	
No. 278 / EC / KEPK – S1 – FARM / 04 / 2014	
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN	
JUDUL	: Efek Ekstrak Etanol Daun Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) terhadap Ekspresi <i>Toll-like Receptor 4</i> (TLR4) dan Apoptosis Sel Kanker Payudara MCF-7
PENELITI UTAMA	: Indah Lestari
UNIT / LEMBAGA	: S1 Farmasi - Fakultas Kedokteran - Universitas Brawijaya Malang
TEMPAT PENELITIAN	: Laboratorium Farmasi FKUB, Lab Biokimia FKUB, dan Laboratorium Pengujian dan Penelitian Terpadu UGM
DINYATAKAN LAIK ETIK.	
Malang, 22 APR 2014	
An. Ketua, Kordinator Divisi I	
	
Prof. Dr. dr. Teguh W. Sardjono, DTM&H, MSc, SpPark NIP. 19520410 198002 1 001	
Catatan : Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol)	

Lampiran 3. Determinasi *Moringa oleifera*
**DINAS KESEHATAN PROPINSI JAWA TIMUR
UPT MATERIA MEDICA**

 Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396 Batu (65313)
KOTA BATU

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

Memenuhi permohonan saudara :

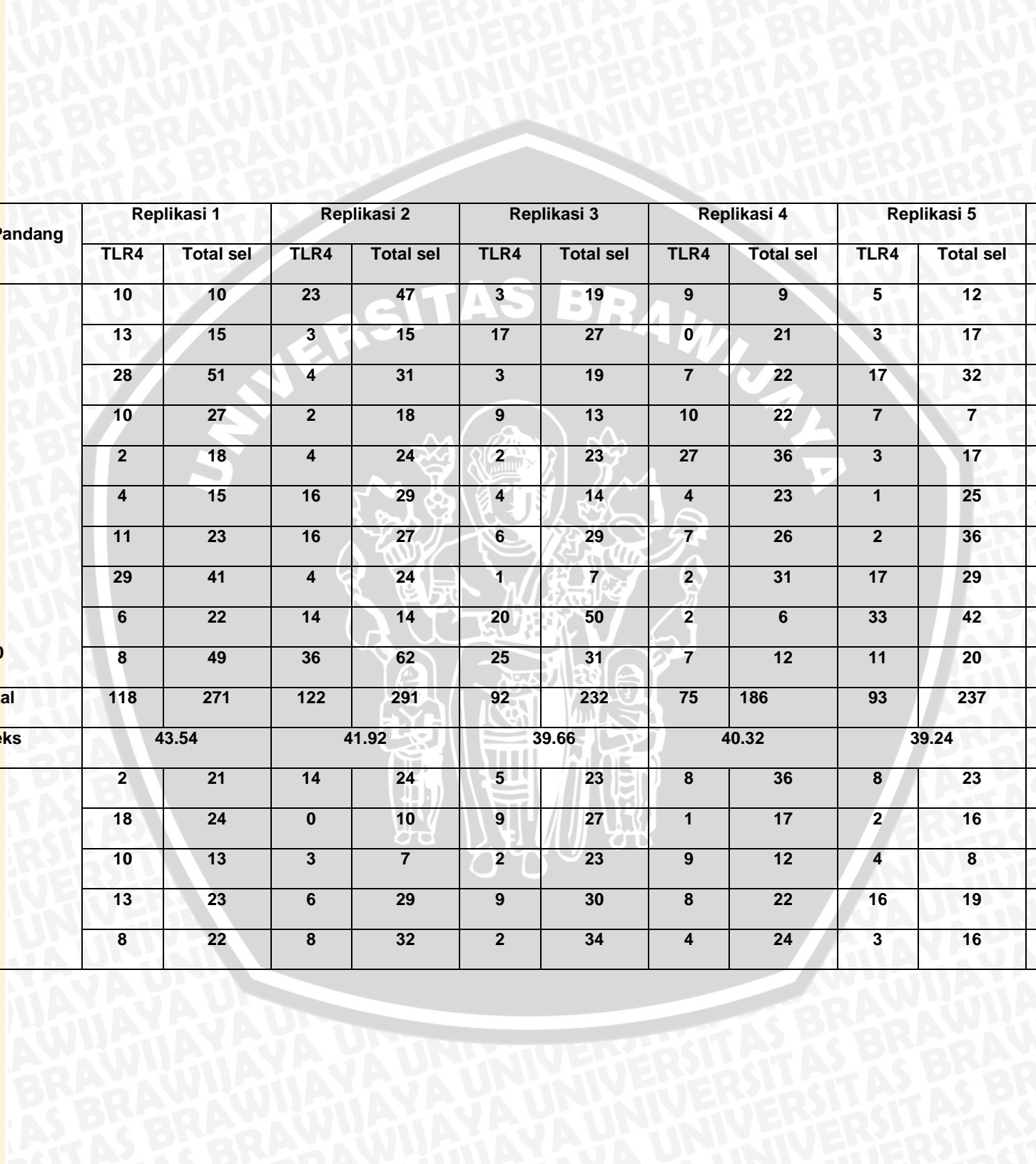
Nama	:	ABNI RACHMI	(105070500111037)
		ERITA RAHMANI	(105070500111017)
		INDAH LESTARI	(105070500111015)
		NABILA ANDJANI	(105070500111006)
		RISKA ROSIDA	(105070501111011)
Fakultas	:	Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang	

1. Perihal determinasi tanaman Kelor
 - Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
 - Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
 - Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
 - Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
 - Kelas : Dicotyledonae
 - Sub kelas : Dilleniidae
 - Bangsa : Capparales
 - Suku : Moringaceae
 - Marga : Moringa
 - Jenis : *Moringa oleifera, Lamk.*
 - Sinonim : *Moringa pterygosperma Gaertn. N. W.*
Kelor (Indonesia, Jawa, Sunda, Bali, Lampung), Kerol (Buru); Marangghi (Madura), Moltong (Flores), Kelo (Gorontalo); Keloro (Bugis), Kawano (Sumba), Ongge (Bima); Hau fo (Timor).
 - Kunci determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15b-197b-208b-209b-210b-211b-214a-1
2. Morfologi : Habitus Pohon, tinggi + 8 m. Batang Berkayu, bulat, bercabang, berbintik hitam, putih kotor. Daun Majemuk, panjang 20-60 cm, anak daun bulat telur, tepi rata, ujung berlekuk, menyirip ganjil, hijau Bunga Majemuk, bentuk malai, letak di ketiak daun, panjang 10-30 cm. daun kelopak hijau, benang sari dan putik kecil, mahkota putih, putih. Buah Polong, panjang 20-45 cm, berisi 15-25 biji, coklat kehitaman Biji Bulat, bersayap tiga, hitam. Akar Tunggang, putih kotor
3. Nama Simplisia : *Moringae Folium* / Daun kelor
4. Kandungan kimia : Akar: saponin, polifenol, zat pahit, getir dan pedas. Daun: saponin, polifenol dan minyak atsiri. kulit batang saponin polifenol dan alkaloid Biji : minyak dan lemak.
5. Penggunaan : Penelitian
6. Daftar Pustaka :
 - Anonim, /http.www.iptek.net.id/ kelor . Diakses tanggal 22 Oktober 2010
 - Anonim, /http.www.plantamor.id/ kelor . Diakses tanggal 11 Desember 2010
 - Anonim, /http.www.warintek.ristek.com/ kelor . Diakses tanggal 4 Oktober 2006
 - Steenis, CGGJ Van Dr , *FLORA*, 2008, Pradnya Paramita , Jakarta
 - Syamsuhidayat, Sri sugati, Hutapea, Johny Ria. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia : Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan

Demikian determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

 Batu, 25 FEBRUARI 2014
 Kepala UPT Materia Medica Batu

 Drs. Husni R.M. Apt. MKes.
 NIP.196111021991031003

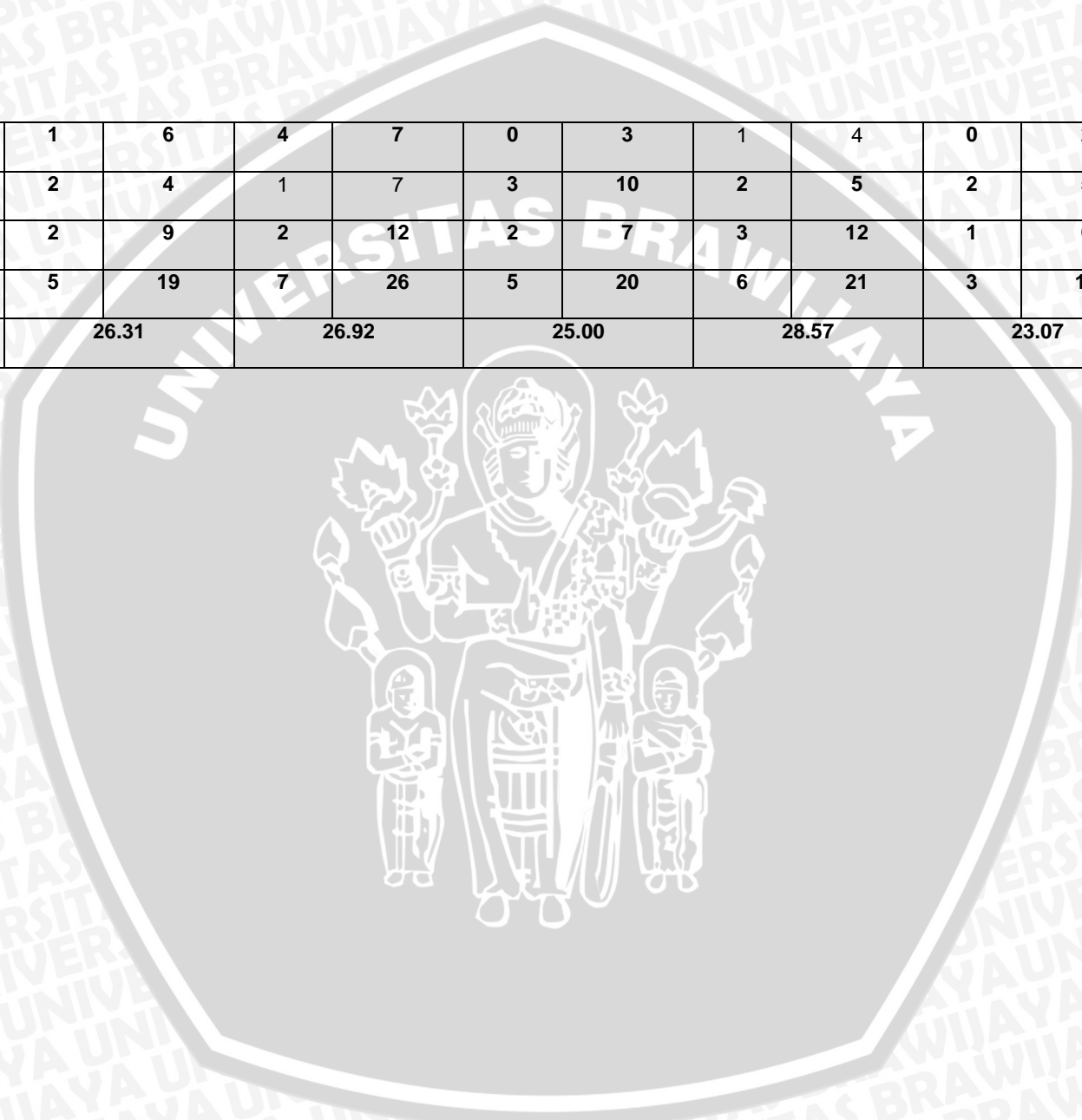


Perlakuan	Lapang Pandang	Replikasi 1		Replikasi 2		Replikasi 3		Replikasi 4		Replikasi 5		Replikasi 6	
		TLR4	Total sel	TLR4	Total sel	TLR4	Total sel	TLR4	Total sel	TLR4	Total sel	TLR4	Total sel
Kontrol	1	10	10	23	47	3	19	9	9	5	12	15	15
	2	13	15	3	15	17	27	0	21	3	17	20	42
	3	28	51	4	31	3	19	7	22	17	32	5	22
	4	10	27	2	18	9	13	10	22	7	7	4	16
	5	2	18	4	24	2	23	27	36	3	17	4	18
	6	4	15	16	29	4	14	4	23	1	25	7	33
	7	11	23	16	27	6	29	7	26	2	36	10	27
	8	29	41	4	24	1	7	2	31	17	29	19	34
	9	6	22	14	14	20	50	2	6	33	42	6	30
	10	8	49	36	62	25	31	7	12	11	20	15	33
		Total	118	271	122	291	92	232	75	186	93	237	105
	Indeks	43.54		41.92		39.66		40.32		39.24		38.89	
½ IC ₅₀	1	2	21	14	24	5	23	8	36	8	23	8	10
	2	18	24	0	10	9	27	1	17	2	16	11	29
	3	10	13	3	7	2	23	9	12	4	8	18	30
	4	13	23	6	29	9	30	8	22	16	19	11	20
	5	8	22	8	32	2	34	4	24	3	16	6	18



	6	9	18	12	15	15	16	17	21	4	21	5	23
	7	0	11	10	23	13	19	1	18	0	14	9	17
	8	0	21	7	15	5	20	14	24	20	29	6	9
	9	8	16	14	21	8	12	18	25	13	18	4	18
	10	5	20	2	23	13	21	17	33	1	19	2	30
	Total	73	190	76	199	81	225	80	209	71	183	80	204
	Indeks	41.29		38.19		36.00		38.28		38.80		39.21	
IC ₅₀	1	4	20	15	29	10	17	4	21	2	14	2	13
	2	9	13	1	34	4	31	2	29	1	22	10	17
	3	7	28	7	40	4	30	5	32	4	35	6	36
	4	3	33	1	23	4	39	4	26	3	46	4	34
	5	6	21	9	28	5	25	5	44	8	38	9	27
	6	5	19	12	27	15	32	2	27	9	9	20	32
	7	6	14	3	8	6	21	8	8	7	23	3	21
	8	0	28	7	8	5	23	8	28	7	13	7	62
	9	8	19	2	45	0	15	8	19	3	22	5	72
	10	5	56	4	34	5	41	7	13	6	16	2	9
		Total	53	251	61	276	58	274	53	247	50	238	68
	Indeks	21.11		22.10		21.16		21.45		21.08		21.10	

2x IC ₅₀	1	1	6	4	7	0	3	1	4	0	2	0	5
	2	2	4	1	7	3	10	2	5	2	5	3	3
	3	2	9	2	12	2	7	3	12	1	6	2	9
	Total	5	19	7	26	5	20	6	21	3	13	5	17
Indeks	26.31		26.92		25.00		28.57		23.07		29.41		



Lampiran 5. Indeks Apoptosis sel MCF-7

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	21.73913043		26.66666667		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	27.77777778		33.33333333		38.88888889		45.45454545		44.44444444		27.27272727	
IC50	1	8	8	8	8	7	25	9	17	15	27	8	8
	2	8	17	6	10	5	10	8	14	7	14	10	15
	Total	16	25	14	18	12	35	17	31	22	41	18	23
	Indeks	64		77.77777778		34.28571429		54.83870968		53.65853659		78.26086957	
2 x IC50	1	14	19	5	5	7	7	7	7	10	11	17	18
	2	5	5	6	7	5	6	2	2	3	3	5	5
	Total	19	24	11	12	12	13	9	9	13	14	22	23
	Indeks	79.16666667		91.66666667		92.30769231		100		92.85714286		95.65217391	

Lampiran 6 Uji Normalitas, Uji Homogenitas, dan Uji Spearman Penentuan IC₅₀

menggunakan MTT Assay

1. Uji Normalitas

Tests of Normality

	DosisEkstrak	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ProliferasiSel	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 ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
proliferasiSel	.175	60	.000	.896	60	.000

a. Lilliefors Significance Correction



2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

ProliferasiSel			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.775	19	40	.000

3. Uji Spearman

Correlations

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

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



Lampiran 7. Data Penentuan Ekspresi TLR4 dengan imunositokimia

Tests of Normality

	dosis	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
persenkematian	kontrol	.228	6	.200*	.896	6	.350
	1100	.232	6	.200*	.950	6	.740
	2200	.334	6	.035	.719	6	.010
	4400	.142	6	.200*	.977	6	.935

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

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

persenkematian

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol	6	40.5950	1.79564	.73307	38.7106	42.4794	38.89	43.54
1100	6	38.6283	1.71312	.69938	36.8305	40.4261	36.00	41.29
2200	6	21.3333	.39998	.16329	20.9136	21.7531	21.08	22.10
4400	6	26.5467	2.32238	.94811	24.1095	28.9839	23.07	29.41
Total	24	31.7758	8.40628	1.71593	28.2262	35.3255	21.08	43.54

Test of Homogeneity of Variances

persenkematian

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.381	3	20	.100

Test Statistics^{a,b}

	persenkematian
Chi-Square	20.567
df	3
Asymp. Sig.	.000

- a. Kruskal Wallis Test
- b. Grouping Variable: dosis

Ranks				
	dosis	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	kontrol	6	8.67	52.00
persenkematian	1100	6	4.33	26.00
	Total	12		

Test Statistics ^a	
	persenkematian
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	26.000
Z	-2.082
Asymp. Sig. (2-tailed)	.037
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.041 ^b

- a. Grouping Variable: dosis
- b. Not corrected for ties.

Ranks				
	dosis	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	kontrol	6	9.50	57.00
persenkematian	2200	6	3.50	21.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	persenkematian
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: dosis

b. Not corrected for ties.

Ranks				
	dosis	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	kontrol	6	9.50	57.00
persenkematian	4400	6	3.50	21.00
	Total	12		

Test Statistics ^a	
	persenkematian
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: dosis

b. Not corrected for ties.

Ranks				
	dosis	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	1100	6	9.50	57.00
persenkematian	4400	6	3.50	21.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	persenkematan
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: dosis

b. Not corrected for ties.

Ranks

	dosis	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	2200	6	3.50	21.00
persenkematan	4400	6	9.50	57.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	persenkematan
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

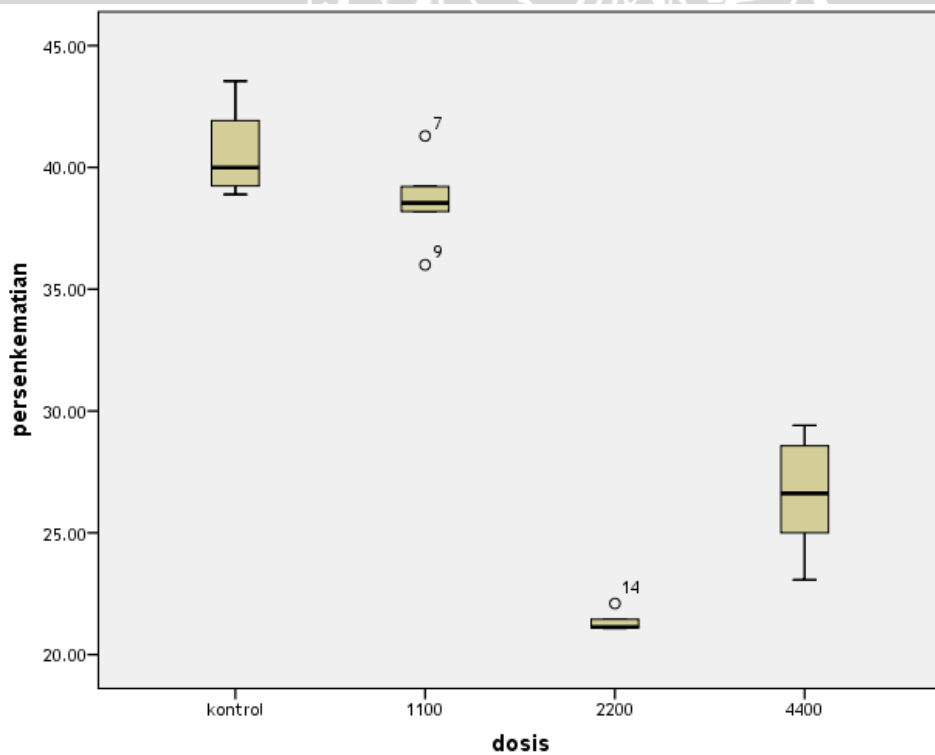
a. Grouping Variable: dosis

b. Not corrected for ties.

Correlations

		dosis	persenkematian
Spearman's rho	Correlation Coefficient	1.000	-.748**
	Sig. (2-tailed)	.	.000
	N	24	24
	Correlation Coefficient	-.748**	1.000
	Sig. (2-tailed)	.000	.
		N	24

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





Lampiran 8. Data Uji Apoptosis

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

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

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

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

Test of Homogeneity of Variances

Apoptosis	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	2,358	3	20	,102

ANOVA

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

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Apoptosis

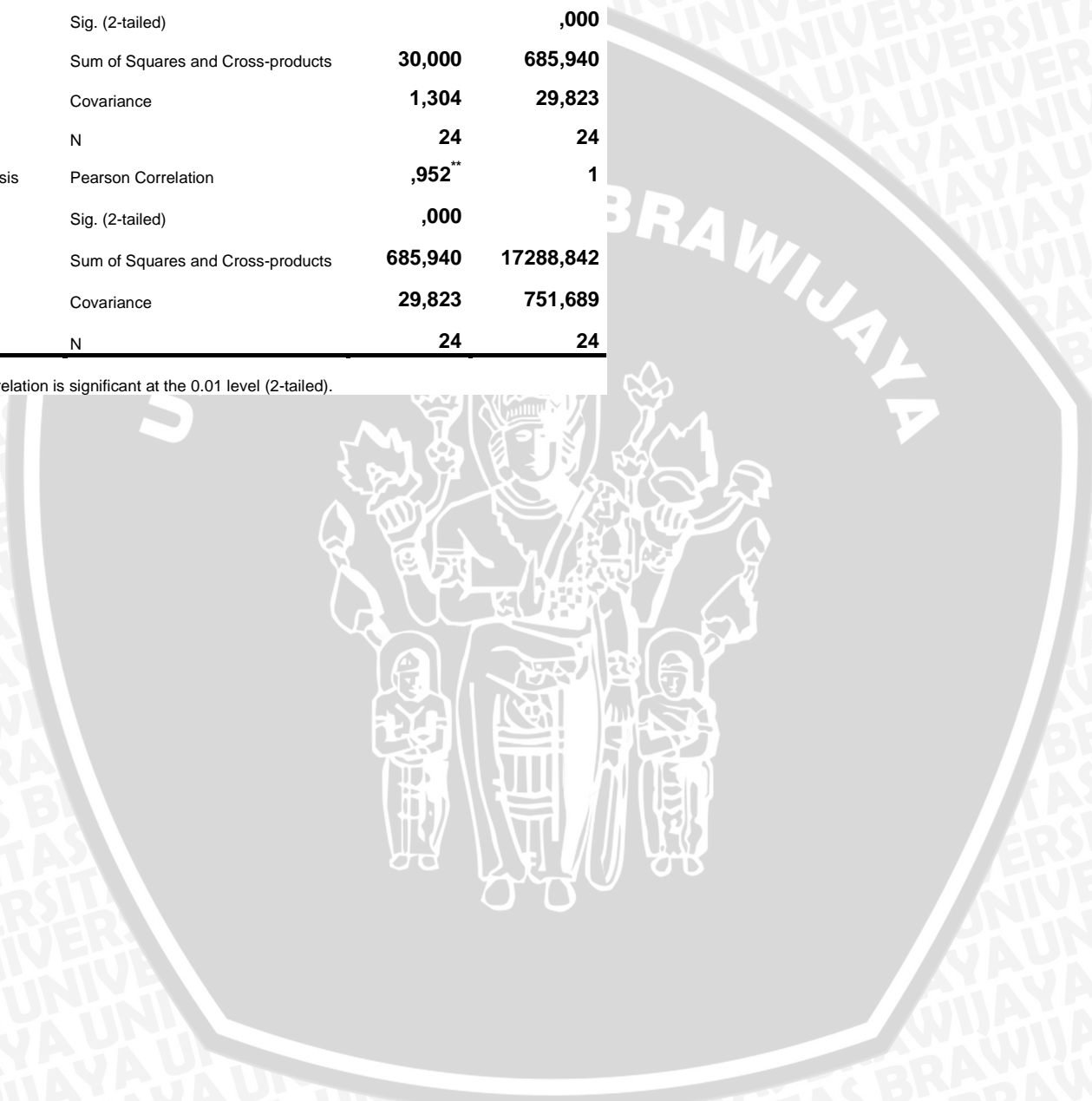
	(I) konsentrasi	(J) konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
Tukey HSD	kontrol	kontrol						
		1100	-13,12500*	4,01235	,018	-24,3553	-1,8947	
		2200	-35,14667*	4,01235	,000	-46,3770	-23,9163	
		4400	-68,87500*	4,01235	,000	-80,1053	-57,6447	
		1100	13,12500*	4,01235	,018	1,8947	24,3553	
		1100						
		2200	-22,02167*	4,01235	,000	-33,2520	-10,7913	
		4400	-55,75000*	4,01235	,000	-66,9803	-44,5197	
		2200	35,14667*	4,01235	,000	23,9163	46,3770	
	1100	22,02167*	4,01235	,000	10,7913	33,2520		
	2200							
	4400	-33,72833*	4,01235	,000	-44,9587	-22,4980		
	4400	68,87500*	4,01235	,000	57,6447	80,1053		
	1100	55,75000*	4,01235	,000	44,5197	66,9803		
	2200	33,72833*	4,01235	,000	22,4980	44,9587		
	4400							
	LSD	kontrol	kontrol					
			1100	-13,12500*	4,01235	,004	-21,4946	-4,7554
2200			-35,14667*	4,01235	,000	-43,5163	-26,7770	
4400			-68,87500*	4,01235	,000	-77,2446	-60,5054	
1100			13,12500*	4,01235	,004	4,7554	21,4946	
1100								
2200			-22,02167*	4,01235	,000	-30,3913	-13,6520	
4400			-55,75000*	4,01235	,000	-64,1196	-47,3804	
2200			35,14667*	4,01235	,000	26,7770	43,5163	
1100		22,02167*	4,01235	,000	13,6520	30,3913		
2200								
4400		-33,72833*	4,01235	,000	-42,0980	-25,3587		
4400		68,87500*	4,01235	,000	60,5054	77,2446		
1100		55,75000*	4,01235	,000	47,3804	64,1196		
2200		33,72833*	4,01235	,000	25,3587	42,0980		
4400								

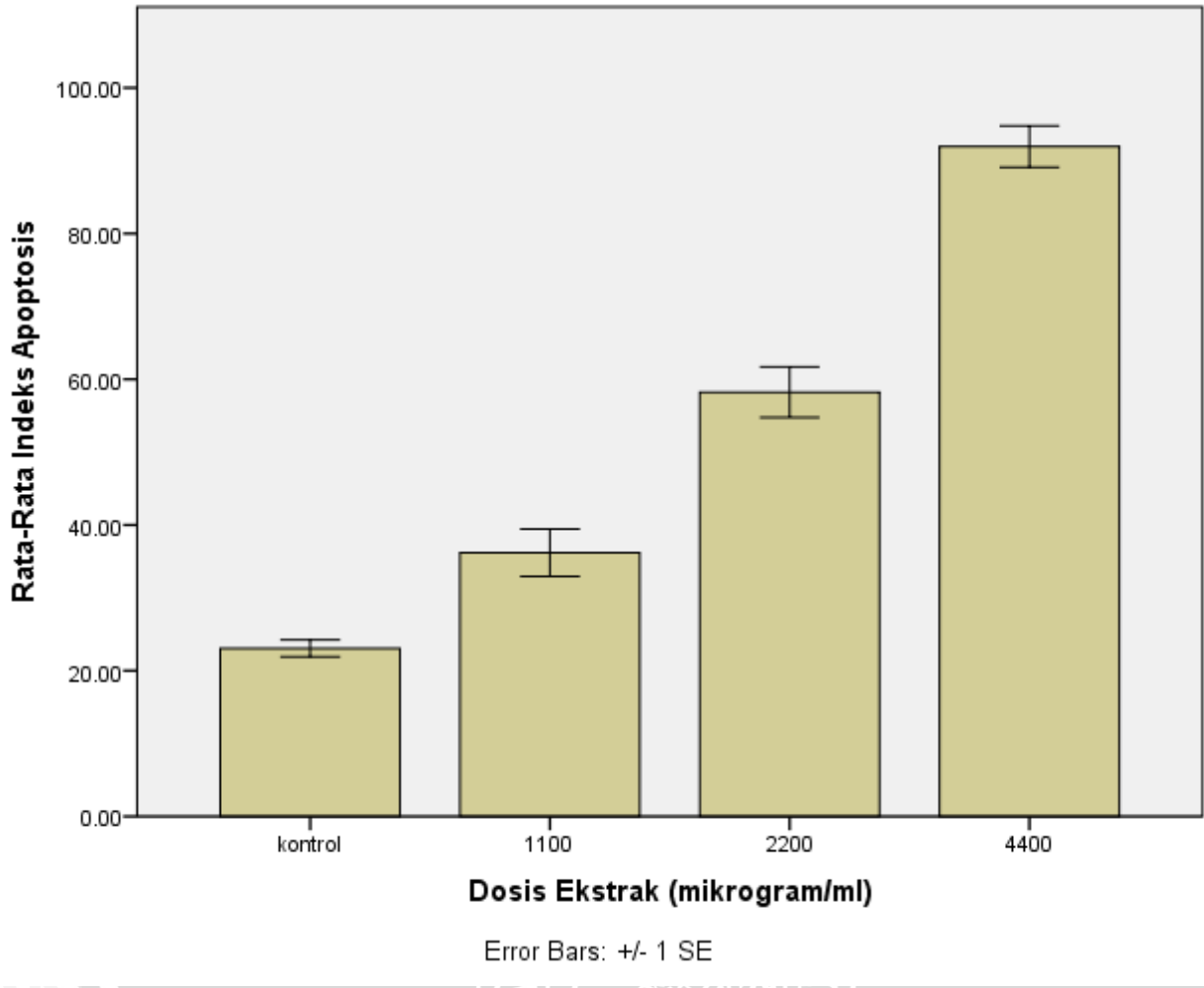
*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Correlations

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

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





Lampiran 9. Hasil Pengamatan Uji Fitokimia

1. Pengamatan Kandungan Fenol



Kandungan fenol terlihat dari terbentuknya warna hijau kehitaman setelah penambahan reagen FeCl_3 .

2. Pengamatan Kandungan Alkaloid



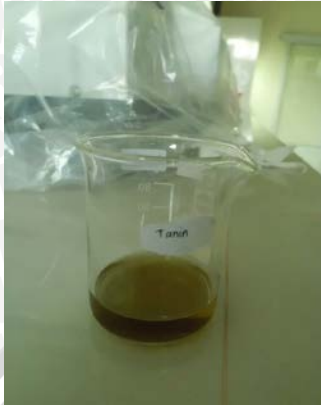
Kandungan alkaloid terlihat dari endapan warna oranye kecoklatan yang terbentuk setelah penambahan reagen Dragendorff.

3. Pengamatan Kandungan Saponin



Lapisan buih yang muncul tebal sekitar 1 cm dan konsisten dalam beberapa saat menunjukkan adanya saponin yang terkandung dalam ekstrak.

4. Pengamatan Kandungan Tanin



Kandungan tannin dalam ekstrak dilihat melalui adanya warna biru kehitaman yang terbentuk setelah pemberian FeCl_3 .

5. Pengamatan Kandungan Terpenoid



Tidak terbentuk warna coklat kemerahan pada permukaan larutan ekstrak yang sudah diberi kloroform dan H_2SO_4 pekat, menandakan ekstrak tidak mengandung terpenoid.

6. Pengamatan Kandungan Flavonoid



Terbentuknya Flavonoid terkandung dalam ekstrak ditandai dengan terbentuknya warna kuning yang pekat (a) setelah pemberian NaOH 5%, kemudian warna kuningnya pudar (b) setelah ditambahkan larutan HCl.