

**EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN KELOR (*Moringa oleifera*) TERHADAP NUCLEAR FACTOR KAPPA BETA (NF- $\kappa$ B) AKTIF DAN APOPTOSIS CELL LINE KANKER MCF-7**

Nabila Andjani\*, Hidayat Sujuti\*\*✉, Sri Winarsih\*\*\*

**Abstrak**

Aktivasi NF- $\kappa$ B, suatu parameter apoptosis kanker, menyebabkan induksi beberapa fungsi seluler antara lain proliferasi sel meningkat dan penurunan apoptosis. Daun kelor (*Moringa oleifera*) secara ayurveda telah terbukti dalam mencegah penyakit leukemia dan *skin papillomagenesis*. Tujuan penelitian ini ialah membuktikan bahwa pemberian ekstrak daun kelor menurunkan aktivitas sel kanker payudara MCF-7. Penelitian ini menggunakan *true experimental in vitro design* dengan sel MCF-7. MTT Assay dilakukan dengan menggunakan dosis terapi dari rentang 7,1825–20000  $\mu$ g/ml untuk menentukan IC<sub>50</sub> pada sel MCF-7. IC<sub>50</sub> yang didapatkan adalah dosis 2200  $\mu$ g/ml. Immunositokimia dan TUNEL assay dengan kelompok kontrol negatif, kelompok perlakuan dosis 1100, 2200, 4400  $\mu$ g/ml. Terdapat perbedaan signifikan yang lebih rendah pada perlakuan dosis 2200  $\mu$ g/ml ( $p = 0,000$ ) dan dosis 4400  $\mu$ g/ml ( $p = 0,000$ ) dibandingkan kontrol tanpa terapi pada aktivitas NF- $\kappa$ B. Besar persentase aktivitas NF- $\kappa$ B pada dosis 2200  $\mu$ g/ml adalah 31,651% dan 4400  $\mu$ g/ml adalah 36,575%. Namun, apoptosis pada MCF-7 tidak dapat dilihat. Kesimpulan dari penelitian ini ialah ekstrak daun kelor dapat menurunkan aktivitas sel MCF-7, ekstrak daun kelor dapat menurunkan jumlah NF- $\kappa$ B aktif pada dosis 2200 dan 4400  $\mu$ g/ml. Dosis IC<sub>50</sub> yang diperoleh adalah 2200  $\mu$ g/ml, dan peristiwa apoptosis tidak dapat diamati.

Kata kunci: daun kelor (*Moringa oleifera*), kanker payudara, MCF-7, NF- $\kappa$ B.

**EFFECTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACT MORINGA LEAVES (*Moringa oleifera*) AGAINST NUCLEAR FACTOR KAPPA BETA (NF- $\kappa$ B) ACTIVE AND APOPTOSIS IN CANCER CELL LINE MCF-7****Abstract**

Activation of NF- $\kappa$ B (cancer apoptosis parameter) caused induction of some cellular function, including increased of cell proliferation and decreased apoptosis. Moringa leaves (*Moringa oleifera*) based on ayurvedic was reported can prevent leukemia and skin papillomagenesis. The aim of this research was to prove Moringa leaves extract can reduce the activity of breast cancer cells MCF-7. This research was used true experimental in vitro design. MTT Assay performed by administering the therapeutic dose range of 7.1825–20000  $\mu$ g/ml to determine the IC<sub>50</sub> in MCF-7 cells. IC<sub>50</sub> obtained was 2200  $\mu$ g/ml. Immunocytochemistry and TUNEL assay with negative control group, treated with different dosage group 1100, 2200, 4400  $\mu$ g/ml. There were lower significant differences in therapeutic dose 2200  $\mu$ g/ml ( $p = 0.000$ ) and dose 4400  $\mu$ g/ml ( $p = 0.000$ ) compared to controls without therapy on the activity of NF  $\kappa$ B. The percentage of NF- $\kappa$ B activity at doses 2200  $\mu$ g/ml was 31.651% and 4400  $\mu$ g/ml was 36.575%. Apoptosis of cells MCF-7 can not be observed. To conclude, moringa leaves extract can inhibit activity of MCF-7, IC<sub>50</sub> was 2200  $\mu$ g/ml and moringa leaves extract can decrease NF- $\kappa$ B activity at dosage 2200 and 4400  $\mu$ g/ml, and apoptosis can not be observed.

Key words: breast cancer, MCF-7, moringa leaves (*Moringa oleifera*), NF- $\kappa$ B.

\* Program Studi Farmasi, FKUB

\*\* Laboratorium Biokimia, FKUB

\*\*\* Laboratorium Mikrobiologi, FKUB

---

✉ E-mail: hidayatsujuti@yahoo.com

## Pendahuluan

Kanker adalah pertumbuhan sel yang tidak normal atau terus menerus dan tidak terkontrol, dapat merusak jaringan sekitarnya serta dapat menjalar ke tempat lain yang disebut metastasis.<sup>1</sup> Salah satu parameter dari pertumbuhan kanker adalah NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B adalah faktor transkripsi dengan suatu urutan spesifik tertentu yang dikenal sebagai molekul kunci dalam inflamasi, karena mengatur program transkripsi proinflamasi yang mengatur dan melaksanakan respon inflamasi. NF- $\kappa$ B juga berfungsi untuk mengatur ekspresi dari beberapa gen yang dapat menekan apoptosis, meningkatkan transisi epitel ke *mesenchymal* (yang memiliki peran penting dalam invasi tumor), dan merangsang progresi siklus sel tumor.<sup>2</sup>

Pengobatan yang dilakukan untuk mengatasi kanker payudara selama ini adalah dengan operasi, radioterapi, kemoterapi dan obat-obatan, yang banyak menimbulkan efek samping.<sup>3</sup> Oleh karena itu, penggunaan produk herbal merupakan salah satu cara untuk mengatasi kanker payudara yang dianggap lebih aman dibandingkan dengan obat-obatan sintesis. Salah satu tanaman yang berdasarkan *ethnomedicine* telah terbukti berkhasiat sebagai anti kanker adalah daun kelor (*Moringa oleifera*).

Daun kelor (*Moringa oleifera*) secara ayurveda telah terbukti dalam mencegah penyakit leukemia, *skin papilomagenesis*, proteksi terhadap radiasi pada sum-sum tulang, dan dapat juga digunakan untuk mengurangi efek samping dari terapi radiasi.<sup>4</sup> Menurut penelitian sebelumnya, daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menghambat dari pertumbuhan sel kanker pankreas.<sup>5</sup> Oleh karena itu, ingin diteliti pengaruh ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) sebagai terapi alternatif antikanker payudara.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam menurunkan aktivitas *cell line* kanker payudara MCF-7.

## Bahan dan Metode

Penelitian ini telah mendapatkan surat keterangan kelaikan etik (*Ethical Clearance*) No. 235/EC/KEPK-S1-FARM/03/2014 yang dikeluarkan pada tanggal 24 Maret 2014 oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

### Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan adalah sel MCF-7 yaitu *cell line* kanker payudara. Dosis untuk memperoleh IC<sub>50</sub> dengan MTT assay yaitu 7,1825–20000  $\mu$ g/ml. Sementara itu, dosis yang digunakan untuk uji aktivitas dan uji apoptosis menggunakan dosis IC<sub>50</sub> yang diperoleh melalui MTT assay yakni dosis IC<sub>50</sub>,  $\frac{1}{2}$ IC<sub>50</sub> dan 2xIC<sub>50</sub> serta kontrol (tanpa antibodi primer).

### Ekstraksi Daun Kelor

Serbuk ekstrak daun kelor ditimbang sebanyak 100 gram, selanjutnya diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol sebanyak 1 liter. Remaserasi dilakukan sebanyak dua kali. Hasil maserasi yang diperoleh kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* suhu 50 °C, kecepatan 500 rpm selama 30 menit. Selanjutnya ekstrak kental yang diperoleh dikeringkan dengan menggunakan *vacuum oven*.

### Penentuan Kualitatif Fitokimia

#### Uji Tanin

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

#### Uji Saponin

Ekstrak dilarutkan dalam aquades dengan perbandingan 1 : 1. Sebanyak 2 ml sampel diambil dengan menggunakan gelas ukur, ditambahkan 2 ml aquades, dikocok selama 15 menit, diamati sampel, mengandung saponin jika terbentuk lapisan buih.

#### Uji Flavonoid

Ekstrak dilarutkan dalam aquades dengan perbandingan 1 : 1, 1 ml sampel diambil dengan menggunakan gelas ukur, ditambahkan 5% NaOH sebanyak 5 tetes, diamati warna yang terbentuk, sampel mengandung flavonoid jika berwarna kuning.

#### Uji Terpenoid

Ekstrak dilarutkan dalam aquades dengan perbandingan 1 : 1. Sebanyak 5 mL larutan ekstrak diambil dengan menggunakan gelas ukur, ditambahkan kloroform sebanyak 2 ml, ditambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat sebanyak 3 ml, diamati warna yang terbentuk, sampel mengandung terpenoid jika berwarna coklat kemerahan.

#### Uji Alkaloid

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

#### Uji Fenol

Sebanyak 50 mg ekstrak ditimbang, dilarutkan dalam 5 ml aquades, ditambahkan 23 tetes larutan 5% FeCl<sub>3</sub>, diamati warna yang terbentuk, sampel mengandung fenol jika berwarna hijau gelap.

#### Pemaparan Ekstrak Daun Kelor pada Kultur Sel

Ekstrak daun kelor diencerkan sesuai konsentrasi yang diinginkan di medium sel MCF-7. Larutan ekstrak daun kelor

ditambahkan ke dalam *plate* dan didiamkan selama 24 jam. Dicuci kembali larutan ekstrak daun kelor dengan medium sel.

#### Penentuan IC<sub>50</sub> dengan MTT Assay

Pengujian MTT assay menggunakan *plate* sumur 96. Media dipindahkan dan diresuspensikan sel 1.0 ml dengan media lengkap. Diencerkan sel (cv=cv) hingga 75.000 sel per ml dan digunakan media lengkap untuk mencairkan sel. Ditambahkan 100 µl sel (7500 jumlah sel) ke masing-masing sumur dan diinkubasi selama semalam. Hari berikutnya ditambahkan 20 µl 5 mg/ml MTT masing-masing pada sumuran. Disertakan satu set sumur dengan MTT tetapi tidak dengan sel-sel kontrol. Diinkubasi selama 3,5 jam pada suhu 37 °C dalam *culture hood*. Dikeluarkan media secara hati-hati. Ditambahkan 150 µl pelarut MTT. Ditutup dengan kertas timah dan dikocok sel pada *orbital shaker* selama 15 menit. Dibaca absorbansi pada 590 nm dengan filter referensi dari 620 nm. Dihitung hambatan proliferasi sel dengan rumus.<sup>6</sup> Kemudian dibuat grafik garis linier untuk menentukan IC<sub>50</sub>.

$$\frac{(\text{Absorbansi Rata - rata Kontrol} - \text{Absorbansi Sampel})}{\text{Absorbansi rata - rata kontrol}} \times 100\%$$

#### Pengujian Aktivitas NF-κB menggunakan Metode Imunositokimia

Kultur sel MCF-7 dipanen sesuai dengan protokol panen. Jumlah sel MCF-7 dihitung sesuai dengan protokol penghitungan sel (jumlah sel yang dibutuhkan untuk uji imunositokimia adalah 5x10<sup>4</sup> sel/sumuran (5x10<sup>4</sup> sel/1000 µl DMEM 1640). Disiapkan 24 *well plate* dan *cover slip*. Ditransfer 1000 µl DMEM 1640 suspensi sel ke atas *cover slip*. Sel diinkubasi di dalam inkubator selama semalam. Dibuat tiga konsentrasi sampel ekstrak daun kelor, yaitu pada IC<sub>50</sub>, dua kali IC<sub>50</sub>, dan setengah kali IC<sub>50</sub>, untuk perlakuan sebanyak 1000 µl. Untuk imunositokimia, minimal diperlukan 3 perlakuan: a. perlakuan dengan ekstrak daun kelor, b. kontrol sel

tanpa antibodi primer (akan menunjukkan warna biru), c. kontrol sel dengan antibodi primer (akan menunjukkan warna coklat). Diambil 24 *well plate* yang telah berisi sel dari inkubator CO<sub>2</sub>. Dibuang semua media kultur dari sumuran dengan pipet tetes secara perlahan-lahan. Diisikan PBS masing-masing 500 µl ke dalam sumuran untuk mencuci sel. Dibuang PBS dari sumuran dengan pipet tetes secara perlahan. Dimasukkan tiga sampel dengan konsentrasi ekstrak daun kelor sesuai poin 10 sebanyak 1000 µl ke dalam sumuran. Dimasukkan 1000 µl media kultur untuk kontrol sel. Diinkubasi di dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 15 jam. Disiapkan metanol dingin dan PBS. Diinkubasi dengan sampel dihentikan pada jam ke-15. Dibuang semua media dari sumuran dengan pipet tetes secara perlahan. Disikan PBS 500 µl ke dalam masing-masing sumuran secara perlahan untuk mencuci sel. Dibuang PBS dari sumuran dengan pipet tetes secara perlahan. Diberi label pada masing-masing sumuran. Diteteskan 300 µl metanol dingin, diinkubasi 10 menit di dalam *freezer*. Diberikan metanol secara perlahan, jangan sampai *cover slip* terbalik. Dilakukan pencucian dengan PBS dan akuades sebanyak 2 kali. Diteteskan larutan hidrogen peroksida (*blocking solution*), dan diinkubasi selama 10 menit, dibuang larutan dengan mikropipet. Diteteskan *prediluted blocking serum*, diinkubasi selama 10 menit, dibuang larutan. Diteteskan antibodi monoklonal primer untuk antigen yang ingin diamati, yaitu untuk NF-κB (p50). Ditambahkan 500 µl PBS, diinkubasi selama 5 menit, dan dibuang. Diteteskan antibodi sekunder yang dilabel biotin (*biotinylated universal secondary antibody*), diinkubasi selama 10 menit. Ditambahkan 500 µl PBS, diinkubasi selama 5 menit, lalu dibuang. Diteteskan reagen yang berisi kompleks streptavidin-enzim peroksidase, diinkubasi selama 10 menit. Ditambahkan 500 µl PBS, diinkubasi selama 5 menit, dibuang PBS. Diteteskan larutan substrat kromogen DAB, diinkubasi selama 10 menit. Ditambahkan 500 µl akuades,

kemudian dibuang kembali. Diteteskan larutan Mayer Haematoxylin dan diinkubasi selama 3 menit. Ditambahkan 500 µl akuades, kemudian dibuang kembali. *Cover slip* diangkat dengan pinset secara hati-hati, kemudian dicelupkan dalam xylo. Lalu dicelupkan dalam alkohol, dan dikeringkan. *Cover slip* diletakkan di atas *object glass*, dan ditetesi dengan lem (*mounting media*). Sel diamati dan dihitung jumlah NF-κB aktif di inti sel dengan mikroskop cahaya.

### **Pengujian Apoptosis menggunakan TUNEL Assay**

Sel pada *cover slide* dicuci dengan menggunakan PBS. Kemudian sel diinkubasi dengan *blocking solution* 10 menit pada suhu 15–25 °C. Sel pada *cover slide* dicuci dengan menggunakan PBS setiap setelah melakukan perlakuan. Preparat diinkubasi dengan *permeabilization solution* selama 2 menit di atas es dengan suhu 2–8 °C. Keringkan daerah sekitar sampel. Ditambahkan TUNEL *Reaction Mixture* sebanyak 25 µl. Ditutup dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37 °C dalam kondisi lembab dan gelap. Ditambahkan 25 µl *converter* POD. Diinkubasi pada tempat lembab 30 menit pada suhu 37 °C. Ditambahkan DAB substrat. Diinkubasi selama 10 menit pada suhu 15–25 °C. Ditambahkan reagen Mayer Haematoxylin. Dicuci dengan PBS dan akuades. Dikeringkan dengan oven selama ±24 jam.

### **Analisis Data**

Data yang telah terkumpul diolah dan dilakukan analisis uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas dilakukan menggunakan rumus dari *Saphiro Wilk*. 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. Setelah uji Anova kemudian diuji korelasinya dengan menggunakan uji *post-hoc*. Jika data yang didapatkan tidak homogen secara ANOVA maka selanjutnya dilakukan analisis non parametrik dengan metode *Spearman*.

## Hasil

### Hasil Ekstraksi dan Uji Kualitatif

Hasil ekstraksi daun kelor didapatkan ekstrak sebesar 37,81 g. Pengamatan organoleptik didapatkan hasil ekstrak kental pekat berwarna hijau kehitaman dan berbau khas daun kelor. Hasil uji fitokimia yang didapatkan antara lain ekstrak daun kelor positif mengandung tanin, alkaloid, fenol, flavonoid, dan saponin tetapi tidak ditemukan kandungan terpenoid.

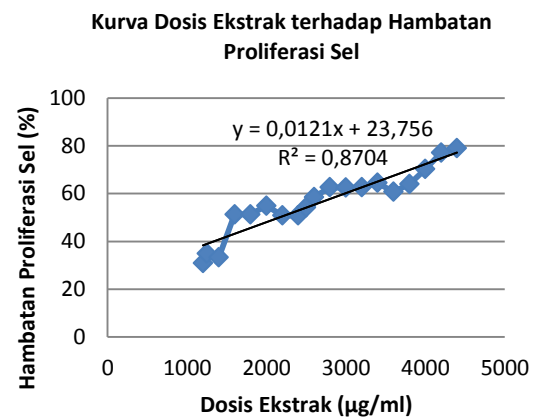
### Dosis IC<sub>50</sub> dengan MTT Assay

Penentuan IC<sub>50</sub> dengan MTT assay didapatkan hasil persen hambatan proliferasi yang mendekati hambatan sebesar 50% (Tabel 1) sebagai berikut:

Tabel 1. Dosis dan persen hambatan proliferasinya

Dosis µg/ml	% Hambatan Proliferasi	Dosis µg/ml	% Hambatan Proliferasi
4400	79,04	2500	54,17
4200	77,07	2400	50,86
4000	70,3	2200	50,86
3800	63,97	2000	54,9
3600	60,78	1800	51,34
3400	64,50	1600	51,34
3200	62,62	1400	33,4
3000	62,5	1250	34,93
2800	62,62	1200	30,9
2600	58,58		

Dosis yang dipakai adalah dosis dengan persen hambatan proliferasi sebesar 50%. Kemudian data persen hambatan proliferasi yang didapat tersebut dibuat kurva regresi liniernya untuk menentukan dosis IC<sub>50</sub>.

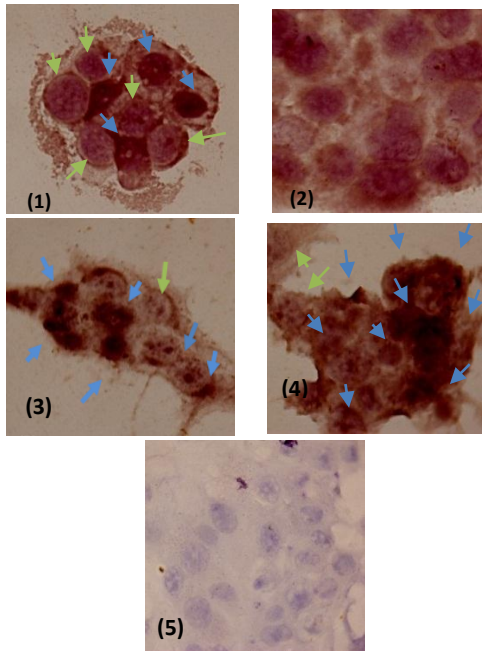


Gambar 1. Grafik MTT assay hubungan dosis ekstrak terhadap persen hambatan proliferasi sel MCF-7.

Persamaan regresi diperoleh untuk menentukan dosis IC<sub>50</sub> (Gambar 1), yang akan diberikan pada kultur sel MCF-7 guna mengetahui aktivasi dari NF-κB. Dosis yang diperoleh berdasarkan persamaan tersebut adalah 2168,92 µg/ml dan dibulatkan menjadi 2200 µg/ml.

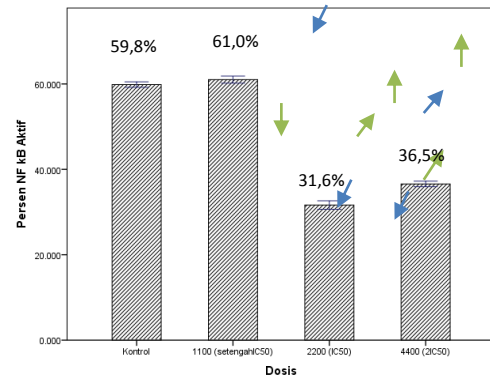
### Deteksi aktivasi dan distribusi NF-κB pada sel MCF-7 dengan Metode Immunositokimia

Berdasarkan pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x dapat dilihat aktivasi dan distribusi NF-κB pada sel MCF-7 pada kontrol sel tanpa perlakuan dan dengan dosis IC<sub>50</sub>, 2xIC<sub>50</sub>, dan ½xIC<sub>50</sub> ekstrak daun kelor didapatkan hasil pada Gambar 2.



Gambar 2. Gambaran mikroskopik kultur sel MCF-7 menggunakan metode immunositokimia yang menunjukkan NF-κB aktif dengan warna cokelat kehitaman (panah biru) dan NF-κB tidak aktif dengan warna ungu kecokelatan (panah hijau) (1000x). Keterangan: (1). kelompok perlakuan dosis  $2 \times IC_{50}$ , (2) kelompok perlakuan dosis  $IC_{50}$ , (3) kelompok perlakuan dosis  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ , (4) kelompok kontrol dengan antibodi, (5) kelompok kontrol tanpa antibodi.

Perhitungan sel dilakukan dengan menghitung jumlah sel MCF-7 yang mengalami aktivasi NF-κB, ditandai dengan warna sel yang kecokelatan pada inti sel. Kemudian dibandingkan dengan jumlah total sel sehingga didapatkan hasil indeks NF-κB aktif.

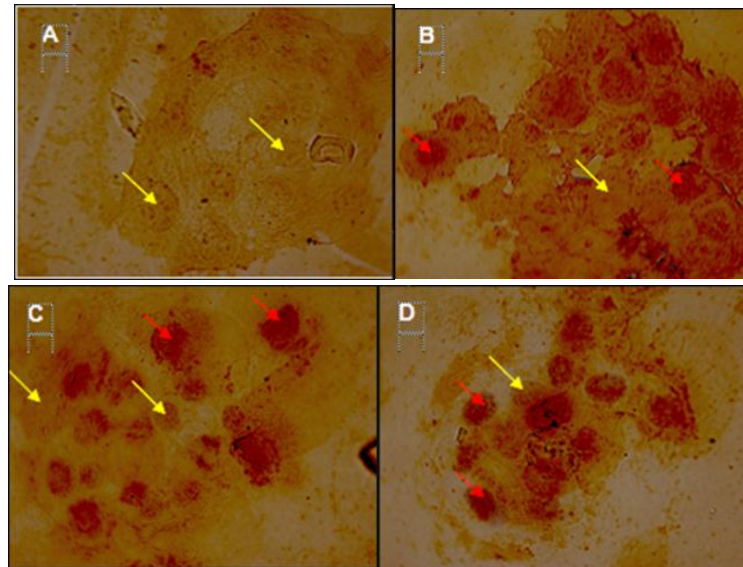


Gambar 3. Pengaruh dosis ekstrak terhadap rata-rata indeks aktivitas NF-κB.

Berdasarkan hasil analisis uji ANOVA untuk menguji antara berbagai kelompok perlakuan terhadap persentase NF-κB aktif, menunjukkan nilai yang signifikan ( $p=0,000 < 0,005$ ). Uji *post-hoc* menunjukkan perbedaan yang bermakna pada kelompok sel MCF-7 yang diberi perlakuan ekstrak daun kelor dengan dosis 2200  $\mu\text{g/ml}$  dan 4400  $\mu\text{g/ml}$  dengan nilai  $p$  yaitu 0,000 dibanding dengan kelompok kontrol. Sementara pada kelompok dosis 1100  $\mu\text{g/ml}$  tidak memiliki perbedaan yang bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol ( $p=0,081$ ).  $*P < 0,05$  berbeda signifikan dibanding kontrol. Pada kelompok terapi dengan dosis 2200  $\mu\text{g/ml}$  dan 4400  $\mu\text{g/ml}$  berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ( $p=0,000$ ).

#### Hasil Uji Apoptosis menggunakan TUNEL Assay

Uji apoptosis dengan menggunakan metode TUNEL assay menunjukkan bentuk sel dengan inti tidak terlihat jelas saat diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x (Gambar 4).



Gambar 4. Gambaran mikroskopik apoptosis sel MCF-7 yang ditandai dengan warna coklat gelap pada inti sel (panah merah) (1000x). Keterangan: (A) kelompok kontrol, (B) kelompok perlakuan ekstrak daun kelor dosis  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ , (C) kelompok perlakuan ekstrak daun kelor dosis  $IC_{50}$ , (D) kelompok perlakuan ekstrak daun kelor dosis  $2 \times IC_{50}$ .

Pada penelitian ini dilakukan TUNEL assay untuk melihat apoptosis dari sel MCF-7 yang diberi perlakuan ekstrak daun kelor dengan dosis  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$  1100  $\mu\text{g/ml}$ ,  $IC_{50}$  2200  $\mu\text{g/ml}$ ,  $2 \times IC_{50}$  4400  $\mu\text{g/ml}$ , dan kontrol tanpa perlakuan ekstrak. Tetapi hasil yang didapatkan tidak dapat dilihat bentuk sel dan apoptosisnya. Meskipun demikian, ada beberapa hasil yang dapat terlihat tetapi jumlahnya sedikit dan tidak representatif, sehingga tidak dapat dilakukan perhitungan jumlah sel dan analisis lebih lanjut. Namun, dengan melihat hasil uji apoptosis pada Gambar 4, dapat diinterpretasikan bahwa makin tinggi dosis cenderung makin banyak sel yang mengalami apoptosis (berwarna cokelat).

### Pembahasan

Sesuai dengan hasil penelitian terdahulu dan uji kualitatif dari ekstrak daun kelor menunjukkan adanya kandungan tannin, alkaloid, fenol, flavonoid, dan saponin.<sup>7</sup> Tetapi pada uji kandungan terpenoid daun kelor menunjukkan hasil yang negatif. Hal ini diduga dikarenakan reagen yang digunakan masih

belum dapat mendeteksi adanya kandungan kimia terpenoid. Terdapat metode lain yang dapat mendeteksi kandungan kimia terpenoid, salah satunya dengan metode Lieberman-Burchard.<sup>8</sup> Pengujian dengan metode Lieberman-Burchard ini masih belum dapat dilakukan dikarenakan keterbatasan bahan dan waktu penelitian. Selain itu, kandungan terpenoid pada daun kelor tidak dapat ditemukan pada penelitian ini juga bisa diduga karena metode ekstraksi yang digunakan, kemungkinan pada ekstraksi maserasi kandungan terpenoid tidak dapat terekstraksi.

MTT assay dilakukan untuk menentukan  $IC_{50}$  (*Inhibition Concentration 50%*) atau dosis daun kelor yang memiliki aktivitas hambatan proliferasi pada sel kanker payudara MCF-7 sebesar 50%. Berdasarkan penelitian sebelumnya didapatkan  $IC_{50}$  daun kelor terhadap kanker pankreas sebesar 1100  $\mu\text{g/ml}$ .<sup>5</sup> Pada kanker kolon tipe sel HCT15, SW48, dan SW480 adalah masing-masing 264,83; 102,40; dan 197,20  $\mu\text{g/ml}$ .<sup>9</sup> Dari data tersebut yang mendasari penggunaan dosis pada penelitian ini. Tetapi dosis  $IC_{50}$  yang diperoleh sebesar 2200  $\mu\text{g/ml}$  pada sel kanker payudara MCF-7. Terdapat perbedaan dosis

IC<sub>50</sub> dapat dikarenakan perbedaan sel kanker yang digunakan dan asal daerah daun kelor yang dimanfaatkan.

Pada penelitian ini, pengaruh daun kelor terhadap aktivitas NF-κB diamati dengan metode immunositokimia. Dosis ekstrak daun kelor diperoleh melalui MTT Assay yaitu IC<sub>50</sub> (2200 µg/ml), ½xIC<sub>50</sub> (1100 µg/ml), dan 2xIC<sub>50</sub> (4400 µg/ml), serta kontrol negatif. Kemudian dihitung jumlah inti sel dengan NF-κB aktif dan dibandingkan dengan total sel keseluruhan dalam 10 lapang pandang sehingga didapatkan indeks NF-κB aktif. Hasil analisis dengan uji ANOVA, menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada tiap dosis. Namun uji *post hoc* tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok kontrol dengan kelompok dosis ½xIC<sub>50</sub> dengan hasil signifikansi 0,081. Sedangkan kelompok dosis lainnya memiliki hasil perbedaan yang signifikan. Uji pearson pada kelompok kontrol, dosis ½xIC<sub>50</sub>, dosis IC<sub>50</sub>, dan dosis 2xIC<sub>50</sub> didapatkan nilai korelasi sebesar -0,834 dan nilai signifikansinya 0,000. Jadi, dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun kelor maka semakin terjadi penurunan terhadap jumlah NF-κB aktif. Walaupun terjadi peningkatan aktivitas NF-κB pada kelompok perlakuan dosis 2xIC<sub>50</sub>.

Terjadinya hambatan aktivitas NF-κB pada sel kanker HeLa karena adanya paparan ekstrak daun kelor. Ekstrak daun kelor mengandung senyawa kimia benzyl isothiocyanate dan phenethyl isothiocyanate yang terbukti memiliki aktivitas anti kanker dengan menghambat aktivitas NF-κB pada sel kanker pankreas dan kanker ovarium.<sup>10</sup> Ekstrak daun kelor juga dapat menurunkan aktivitas NF-κB dengan cara menghambat pembentukan ROS sehingga IKb tidak terfosforilasi dan NF-κB dapat dihambat. Kandungan zat aktif yang diduga memiliki efek tersebut adalah quercetin dan kaempferol, yang termasuk flavonoid yang berfungsi sebagai "scavenging" terhadap radikal bebas sehingga tidak terbentuk ROS secara berlebihan.<sup>11</sup> Pada penelitian ini, dosis tertinggi yang dapat menurunkan aktivitas NF-

κB IC<sub>50</sub> yaitu 2200 µg/ml, tetapi tidak dapat dipastikan jika dosis semakin meningkat maka aktivitas NF-κB semakin menurun.

Hasil pengamatan mikroskop dengan perbesaran 1000x menunjukkan tidak dapat diamatinya bentuk sel secara jelas serta inti sel yang mengalami apoptosis, sehingga tidak dapat dilakukan perhitungan sel secara kuantitatif. Oleh karena itu apoptosis hanya dilihat secara kualitatif, yaitu dari gradasi warna yang tampak. Pada sel HeLa ekstrak daun kelor dapat meningkatkan apoptosis namun tidak terlalu besar.<sup>10</sup> Tetapi pada penelitian ini, belum dapat dilihat pengaruh ekstrak daun kelor terhadap apoptosis sel MCF-7. Jadi perlu dilakukan penelitian lebih lanjut agar pengaruh ekstrak daun kelor terhadap apoptosis sel MCF-7 dapat dilihat.

### Kesimpulan

Ekstrak daun kelor dapat menurunkan aktivitas NF-κB pada sel MCF-7 dibandingkan dengan kontrol. Penurunan aktivitas NF-κB dengan dosis IC<sub>50</sub> 2200 µg/ml sebanyak 31,6% dan dosis 2xIC<sub>50</sub> 4400 µg/ml sebanyak 36,5%. Secara deskriptif ekstrak daun kelor cenderung meningkatkan apoptosis sel MCF-7.

### Daftar Pustaka

1. (Depkes RI) Departemen Kesehatan RI. *Buku Saku Pencegahan Kanker Leher Rahim dan Kanker Payudara*. Jakarta: Depkes RI. 2009.
2. Khiong K, Adhika OA, Chakravitha M. Inflammation, Immunity, and Cancer: The Role of Transcription Factors NF-κB and STAT3. *Majalah Kedokteran Indonesia*. 2010; 60(8):369-373.
3. (NHMRC) National Health and Medical Research Council. *Clinical Practice Guidelines: Management of Early Breast Cancer*. Australia. 2001.
4. Balachandran A, Govindarajan R. *Cancer An Ayurvedic Perspective*.



- Pharmacological Research*. 2005; 51:19–30.
5. Berkovich L et al. *Moringa oleifera* Aqueous Leaf Extract Down-Regulates Nuclear Factor-KappaB and Increases Cytotoxic Effect of Chemotherapy in Pancreatic Cancer Cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2013;13:212.
  6. Putra A, Tjahjono W. Ekstrak Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme*) Fraksi Diklorometanolik dan Ekspresi Caspase-3 dan p21 *Cell-Line* Kanker Payudara MCF-7. *Media Medika Indonesiana*. 2011; 45(2): 95-105.
  7. Yudistira F, Murwani A, Trisunuwati SW. Potensi Antimikroba Ekstrak Air Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap *Salmonella enteritidis* secara *in vitro*. Tugas Akhir. Malang: Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya. 2013.
  8. Gunawan IWG, Bawa IGAG, Sutrisnayanti NL. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Terpenoid yang Aktif Antibakteri Pada Herba Meniran (*Phyllanthus niruri*). Tugas Akhir. Fakultas MIPA. Denpasar: Universitas Udayana. 2008.
  9. Paliwal R, Sharma V, dan Pracheta. A Review on Horse Radish Tree (*Moringa oleifera*) A Multipurpose Tree with High Economic and Commercial Importance. *Asian Journal of Biotechnology*. 2011; 3(4):317-328.
  10. Hermawan A, Nur KA, Samoko DD, Putri P, dan Meiyanto E. Ethanolic Extract of *Moringa oleifera* Increased Cytotoxic Effect of Doxorubicin on Hela Cancer Cells. *Journal of Natural Remedies*. 2012; 12(2):106–114.
  11. Wihastuti AT, Sargowo D, Rohman MS. The Effect of *Moringa oleifera* Leaf Extract in Inhibition of NF- $\kappa$ B Activation, TNF- $\alpha$  and ICAM-1 Expression in Oxydized LDL treated HUVECS. *Jurnal Kardiologi Indonesia*. 2007; 28:181-188.