

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kanker payudara masih menjadi permasalahan kesehatan global yang serius dan merupakan jenis kanker yang paling umum didiagnosis pada wanita. Berdasarkan laporan GLOBOCAN (*Global Cancer Observatory*) 2020, tercatat sekitar 2,3 juta kasus baru kanker payudara secara global, yang menyumbang 11,7% dari seluruh kasus kanker, dengan angka kematian mencapai 685.000 jiwa (Sung et al., 2021). Di Indonesia, situasinya juga memprihatinkan, pada tahun yang sama, diperkirakan terdapat 65.858 kasus baru kanker payudara di Indonesia dengan angka kematian mencapai 22.598 jiwa. Selain menyebabkan tingginya angka mortalitas, kanker payudara juga menimbulkan beban ekonomi yang signifikan bagi pasien dan sistem kesehatan, terutama di negara berkembang. Biaya terapi yang tinggi, kebutuhan perawatan jangka panjang dan hilangnya produktivitas kerja memperparah dampak sosial-ekonomi dari penyakit ini (Kementerian Kesehatan RI, 2020).

Kanker payudara merupakan penyakit yang bersifat heterogen dan diklasifikasikan ke dalam beberapa subtipe molekuler, di mana subtipe *Luminal A* merupakan subtipe yang paling umum ditemukan pada populasi Indonesia, diikuti oleh *triple-negative*, *HER2-positive*, dan *Luminal B* (Rahmawati et al., 2018). Subtipe *Luminal A* ditandai oleh ekspresi reseptor estrogen (ER) dan/atau progesteron (PR) serta ketergantungan yang kuat terhadap sinyal proliferasi yang dimediasi oleh hormon (Jiang et al., 2024). Meskipun memiliki laju proliferasi relatif rendah dan terapi endokrin telah menjadi standar utama pada subtipe ini, penggunaan jangka panjang masih menghadapi kendala berupa munculnya resistensi terapi dan efek samping sistemik yang dapat memengaruhi kualitas hidup pasien (Matthews et al., 2018).

Secara biologis, salah satu karakteristik utama sel kanker adalah kemampuan untuk mengalami proliferasi yang tidak terkendali akibat ketidakseimbangan antara proses proliferasi dan apoptosis (Hanahan & Weinberg, 2011). Pada kanker payudara, termasuk subtipe *Luminal A*, proses ini melibatkan aktivasi berbagai jalur pensinyalan *pro-survival*, seperti PI3K/AKT/mTOR dan MAPK/ERK, yang berperan dalam regulasi siklus sel, metabolisme, dan resistensi terhadap apoptosis (Peng et al., 2022) (Braicu et al., 2019). Dereglulasi ekspresi reseptor hormon estrogen (ER) dan progesteron (PR) pada subtipe tertentu, seperti *Luminal A*, turut mempertahankan aktivitas transkripsi gen *pro-proliferasi* dan menghambat mekanisme pengendalian pertumbuhan normal. Proses tambahan seperti stres oksidatif, peradangan kronis, ketidakstabilan genom, serta kerusakan DNA semakin memperkuat transformasi sel normal menjadi sel kanker (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011). Dengan demikian, penghambatan modulasi jalur pensinyalan tersebut menjadi strategi penting dalam pengembangan terapi antikanker yang lebih efektif dan selektif terhadap sel tumor.

Dalam upaya menemukan agen antikanker yang efektif dan memiliki toksisitas rendah, perhatian terhadap sumber alami seperti tanaman obat semakin meningkat. Salah satu tanaman yang banyak diteliti karena kandungan fitokimianya yang beragam adalah kelor. Kelor (*Moringa oleifera L.*) telah lama dimanfaatkan sebagai tanaman obat

tradisional di berbagai belahan dunia, khususnya di Asia dan Afrika. Tanaman ini mendapat julukan *miracle tree* karena seluruh bagiannya, mulai dari daun, buah, biji, akar, hingga kulit batang memiliki potensi terapeutik yang signifikan (Abd Rani et al., 2019; Hardjo et al., 2025; Singh et al., 2023; Wang et al., 2020). Analisis fitokimia mengungkapkan bahwa *Moringa oleifera L.* kaya akan senyawa bioaktif yang berkontribusi pada beragam aktivitas farmakologis. Studi komprehensif telah mendemonstrasikan berbagai efek terapeutik *Moringa oleifera L.* termasuk aktivitas antioksidan, anti-inflamasi, antimikroba, antidiabetes, dan yang paling menjanjikan adalah potensi antikankernya (Adebayo et al., 2017; Arif et al., 2020; Hamid et al., 2025; Sultan et al., 2023). Secara spesifik, ekstrak kelor (*Moringa Oleifera L.*) telah terbukti menghambat proliferasi sel kanker melalui berbagai mekanisme, termasuk induksi apoptosis, dan modulasi jalur sinyal sel yang terkait dengan pertumbuhan tumor (Wang et al., 2020).

Kulit batang kelor (*Moringa oleifera L.*) dipilih sebagai objek penelitian karena memiliki potensi terapeutik yang masih belum banyak dieksplorasi secara ilmiah, khususnya dalam konteks kanker payudara. Sebagian besar penelitian terdahulu lebih banyak berfokus pada daun dan biji kelor, sementara bagian kulit batangnya cenderung terabaikan dan sering dianggap sebagai limbah dan kurang dimanfaatkan. Menariknya, studi terbaru yang dilaporkan oleh Wang et al. (2020) mengungkapkan bahwa di antara berbagai bagian tanaman kelor, kulit batangnya menunjukkan potensi antikanker yang paling menonjol. (Wang et al., 2020). Oleh karena itu, eksplorasi ilmiah terhadap bagian ini dapat membuka peluang baru dalam pengembangan terapi kanker berbasis bahan alam lokal yang berkelanjutan, terjangkau, dan mudah diakses, terutama di negara berkembang seperti Indonesia.

Pendekatan terpadu antara studi *in silico* dan *in vitro* menjadi strategi penting dalam penelitian pengembangan obat antikanker berbasis bahan alam. Analisis *in silico* memungkinkan prediksi awal interaksi senyawa bioaktif dengan target protein kanker melalui pemodelan molekuler dan analisis jaringan biologis, sehingga dapat mengidentifikasi mekanisme kerja potensial secara efisien sebelum dilakukan uji biologis langsung (Ancuceanu et al., 2025; M. Hu et al., 2023). Sementara itu, uji *in vitro* menggunakan sel kanker seperti MCF-7 memberikan validasi eksperimental terhadap aktivitas antiproliferatif, efek sitotoksik, serta mekanisme induksi apoptosis dari senyawa yang diuji (Gurning et al., 2025; Samdani et al., 2023). Integrasi kedua pendekatan ini tidak hanya mempercepat proses penemuan kandidat obat baru, tetapi juga memperkuat dasar molekuler dari aktivitas biologis yang diamati. Dalam konteks ini, penelitian terhadap ekstrak kulit batang *Moringa oleifera* dengan kombinasi pendekatan *in silico* dan *in vitro* diharapkan mampu mengungkap potensi senyawa bioaktifnya sebagai agen antiproliferatif alami terhadap sel kanker payudara MCF-7, sekaligus memberikan landasan ilmiah bagi pengembangan terapi alternatif yang lebih aman dan efektif. Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti bermaksud melakukan penelitian dengan judul: **“Efek Antiproliferatif Kulit Batang Kelor (*Moringa oleifera L.*) terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 Menggunakan Pendekatan *In silico* dan *In vitro*”**.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, rumusan masalah dalam penelitian ini adalah: Bagaimana efek antiproliferatif kulit batang kelor (*Moringa oleifera* L.) terhadap sel kanker payudara MCF-7 menggunakan pendekatan *in silico* dan *in vitro*?

1.3. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian yaitu:

1.3.1. Tujuan Umum

Menganalisis efek antiproliferatif kulit batang kelor (*Moringa oleifera* L.) terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan menggunakan pendekatan *in silico* dan *in vitro*.

1.3.2. Tujuan Khusus

- 1) Mengidentifikasi senyawa bioaktif dalam kulit batang kelor dan menentukan senyawa dominan yang berpotensi memiliki aktivitas antikanker.
- 2) Menganalisis sifat farmakokinetik dan toksikologis (ADMET) senyawa bioaktif hasil identifikasi untuk menilai kelayakannya sebagai kandidat antikanker secara *in silico*.
- 3) Memprediksi aktivitas biologis (bioaktivitas) senyawa bioaktif terhadap target-target farmakologis yang berhubungan dengan mekanisme antiproliferatif dan apoptosis secara *in silico*.
- 4) Memprediksi dan mengidentifikasi target protein senyawa bioaktif ekstrak berbasis struktur (SMILES) yang relevan dengan kanker payudara subtipe *Luminal A* secara *in silico*.
- 5) Menganalisis interaksi antarprotein menggunakan pendekatan *network pharmacology* untuk mengidentifikasi protein kunci (*hub genes*) yang berperan dalam aktivitas antikanker ekstrak kulit batang kelor.
- 6) Menganalisis ekspresi gen dan jalur molekuler utama yang terlibat dalam penghambatan pertumbuhan sel kanker payudara secara *in silico*.
- 7) Mengevaluasi efek antiproliferatif ekstrak kulit batang kelor terhadap sel kanker payudara MCF-7 melalui pengamatan morfologi sel dan uji sitotoksitas (*MTT assay*) secara *in vitro*.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

- 1) Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi terhadap pengembangan ilmu pengetahuan di bidang biokimia dan biologi molekuler, khususnya dalam eksplorasi senyawa bioaktif dari tanaman obat lokal seperti *Moringa oleifera* L. Hasil penelitian ini akan memperkaya pemahaman ilmiah mengenai senyawa bioaktif dengan aktivitas antikanker, terutama melalui penghambatan proliferasi sel kanker payudara tipe *luminal A*.
- 2) Hasil penelitian ini memperkuat pemahaman tentang mekanisme antiproliferatif dan penghambatan target molekuler spesifik pada sel kanker payudara MCF-7, yang dapat menjadi dasar pengembangan strategi terapi berbasis bahan alam.

1.4.2. Manfaat Praktis

- 1) Penelitian ini meningkatkan kompetensi peneliti dalam penerapan metode riset biomedis terintegrasi, mulai dari identifikasi senyawa, prediksi target molekuler, hingga validasi biologis efek sitotoksik.
- 2) Hasil penelitian berpotensi mendukung pengembangan terapi kanker berbasis bahan alam yang aman, terjangkau, dan berbasis bukti ilmiah, sekaligus meningkatkan pemanfaatan tanaman kelor lokal sebagai sumber kandidat fitofarmaka antikanker.

1.5. Penelitian Terdahulu.

Penelitian terdahulu merujuk pada beberapa penelitian terdahulu mengenai tanaman kelor (*Moringa oleifera L.*) dan kanker payudara antara lain sebagai berikut:

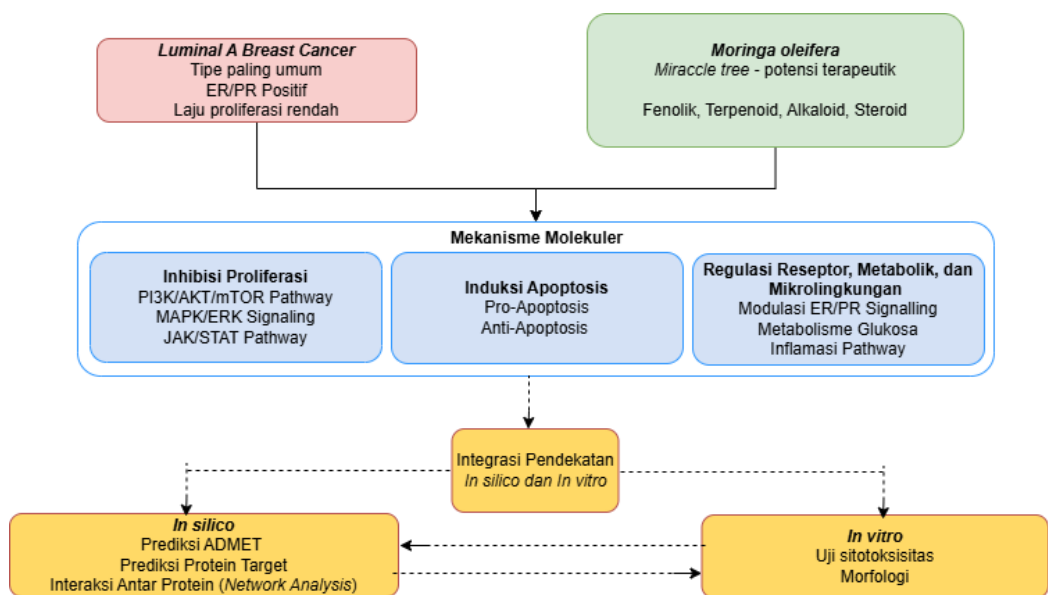
Tabel 1. Penelitian Terdahulu

Nama Peneliti & Tahun	Judul Penelitian	Hasil Penelitian
(Wang et al., 2020)	<i>Antioxidant activities and anti-proliferative effects of Moringa oleifera L. extracts with head and neck cancer</i>	Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak <i>Moringa oleifera</i> (MO) memiliki aktivitas antioksidan dan anti-kanker yang signifikan. Ekstrak air daun (MOL) memiliki aktivitas antioksidan tertinggi, sementara ekstrak etanol 70% dari biji, akar, dan batang (MOS, MOR, MoST) juga menunjukkan aktivitas kuat. Semua ekstrak efektif menghambat pertumbuhan sel kanker kepala dan leher (HNC), dengan MoST menunjukkan potensi tertinggi berdasarkan nilai IC50.
(Sultan et al., 2023)	<i>The anticancer potential of chemical constituents of Moringa oleifera targeting CDK-2 inhibition in estrogen receptor positive breast cancer using in-silico and in vitro approaches</i>	Penelitian ini mengidentifikasi senyawa dari <i>Moringa oleifera</i> seperti asam klorogenat, quercetin, asam ellagic, niazirin, dan kaempferol yang berpotensi menghambat CDK-2, target penting dalam pengobatan kanker payudara estrogen reseptor positif. Uji <i>in vitro</i> dengan metode MTT pada sel MCF-7 menunjukkan bahwa fraksi etil asetat (fraksi B) memiliki efek antiproliferatif signifikan, menurunkan viabilitas sel hingga 40% pada konsentrasi 200 µg/mL, sedangkan fraksi petroleum eter (fraksi A) tidak menunjukkan efek yang berarti.
(Arif et al., 2020)	<i>The combination from ethanol extract of moringa leaves (Moringa oleifera L.) and ethanol extract of papaya leaves (Carica papaya L.) slows the tumor</i>	Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak etanol daun kelor (<i>Moringa oleifera L.</i>) dan ekstrak etanol daun pepaya (<i>Carica papaya L.</i>) dosis 150 mg/kg BB mempunyai

	<i>growth in sprague dawley rats induced 7,12-dimethylbenz(a)anthracene</i>	aktivitas dalam memperlambat pembentukan jaringan tumor.
(Mukherjee et al., 2022)	<i>In silico investigation of the role of vitamins in cancer therapy through inhibition of MCM7 oncoprotein</i>	Hasil penelitian ini mengungkapkan temuan menarik mengenai potensi ergokalsiferol (<i>vitamin D2</i>), kolekalsiferol (<i>vitamin D3</i>), ergosterol (<i>prekursor vitamin D2</i>), dan menakinon (<i>vitamin K2</i>) sebagai penghambat onkoprotein untuk terapi kanker melalui inhibisi MCM7.

1.6. Kerangka Teori-Kerangka Konsep

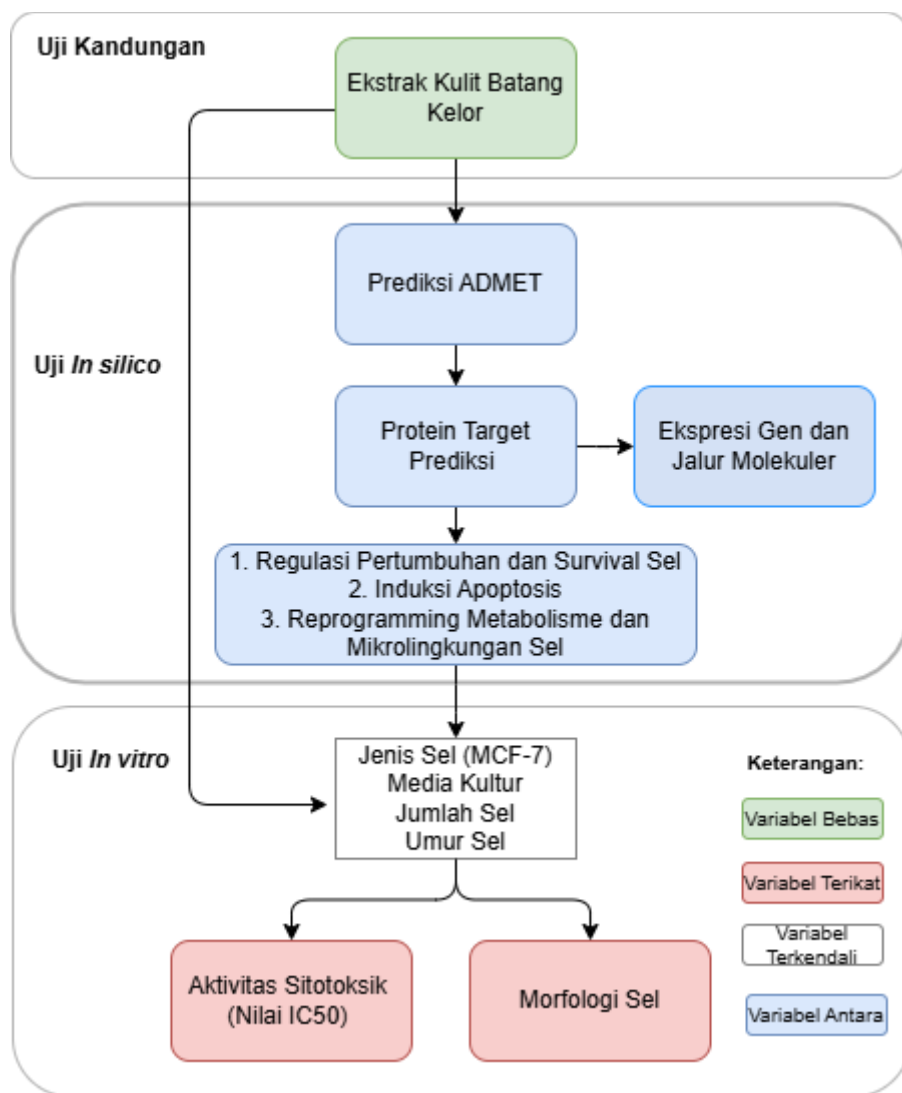
1.6.1. Kerangka Teori



Gambar 1. Kerangka Teori

(Al-Qasem et al., 2022; Biswas et al., 2022; Gan et al., 2020; Goyal et al., 2025; Hamid et al., 2025; Hardjo et al., 2025; Imran et al., 2019; Tian et al., 2024; Yadav & Polasek-Sedlackova, 2024; Yu et al., 2020)

1.6.2. Kerangka Konsep



Gambar 2. Kerangka Konseptual

1.7. Hipotesis

Ekstrak kulit batang kelor (*Moringa oleifera L.*) memiliki efek antiproliferatif terhadap sel kanker payudara MCF-7 melalui mekanisme penghambatan aktivitas protein target proliferasi yang dibuktikan dengan pendekatan *in silico* dan *in vitro*.

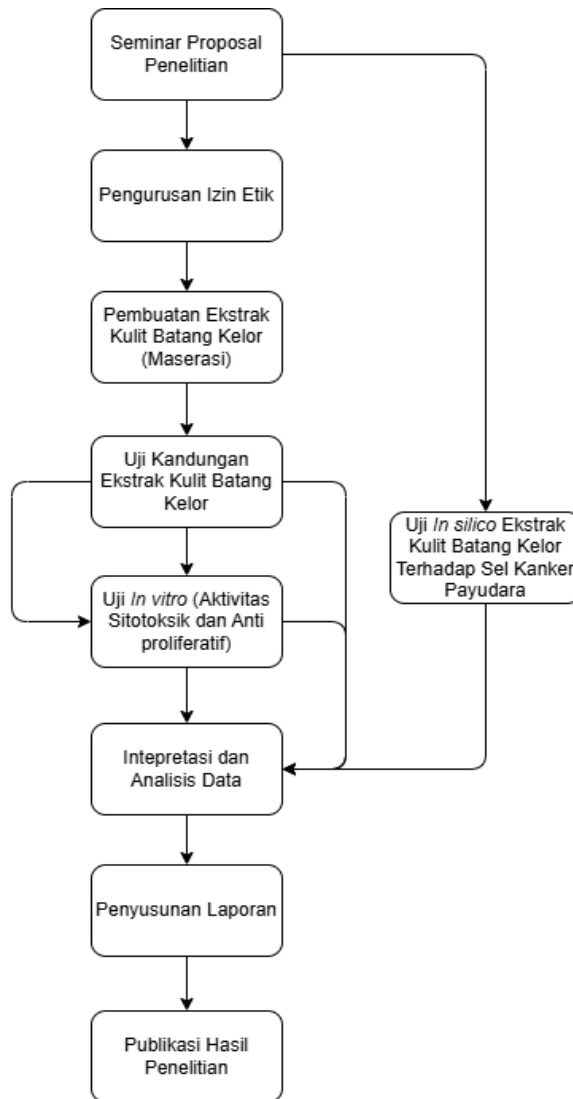
1.8. Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi operasional dari variabel dalam penelitian

Jenis Variabel	Parameter	Definisi Operasional	Skala Ukur
Variabel Bebas	Dosis ekstrak kulit batang kelor (<i>Moringa Oleifera L.</i>)	Ekstrak etanol kulit batang kelor diberikan pada sel kanker payudara MCF-7 dengan variasi dosis 3,90625 – 250 µg/mL , berdasarkan metode uji sitotoksik yang mengacu pada referensi (Wang et al., 2020) dan pedoman (CCRC,2009).	Rasio
Variabel Antara	Jalur molekuler & target protein	Jalur molekuler dan protein target merupakan mekanisme biologis yang menjembatani hubungan antara paparan ekstrak etanol kulit batang kelor dengan efek antiproliferatif pada sel kanker payudara MCF-7. Jalur ini melibatkan interaksi senyawa bioaktif dengan protein kunci yang mengatur proliferasi,apoptosis, dan metabolisme sel kanker diidentifikasi melalui pendekatan <i>in silico</i> .	Nominal
Variabel Terikat	Morfologi Sel MCF-7	Perubahan morfologi sel kanker payudara MCF-7 sebelum dan sesudah perlakuan ekstrak etanol kulit batang kelor, diamati menggunakan mikroskop.	Nominal
Variabel Terikat	Nilai IC 50 (aktivitas sitotoksik)	Konsentrasi ekstrak etanol kulit batang kelor yang mampu menurunkan viabilitas 50% sel MCF-7 berdasarkan hasil uji <i>MTT assay</i> . Semakin kecil nilai IC ₅₀ menunjukkan aktivitas sitotoksik yang lebih kuat.	Rasio
Variabel Terikat	Ekspresi Gen Target (UALCAN)	Tingkat ekspresi gen target pada jaringan kanker payudara dibandingkan jaringan normal, yang diukur melalui analisis <i>in silico</i> menggunakan platform UALCAN (berbasis TCGA). Perubahan ekspresi gen dianalisis untuk menentukan hubungan antara regulasi gen dengan aktivitas antiproliferatif dan jalur apoptosis (Samdani et al., 2023).	Rasio
Variabel Terkendali	Jenis Sel	Jenis sel yang digunakan adalah sel kanker payudara MCF-7, diperoleh dari Laboratorium Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, dengan kondisi sel yang sehat dan aktif.	Nominal

Variabel Terkendali	Kondisi kultur sel	Proses kultur dilakukan pada media DMEM yang diperkaya FBS 10%, suhu 37°C, dan CO ₂ 5%, sesuai dengan panduan praktikum Biokimia FK Universitas Hasanuddin.	Nominal
---------------------	--------------------	--	---------

1.9. Alur Penelitian



Gambar 3. Alur Penelitian

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1. Jenis Penelitian

Studi ini merupakan penelitian komputasional dan eksperimental dengan desain *post-test only* untuk menganalisis efek anti proliferasi ekstrak kulit batang kelor terhadap sel kanker payudara MCF-7.

2.2. Waktu dan Lokasi Penelitian

2.2.1. Waktu Penelitian

Penelitian ini direncanakan pada bulan Mei sampai Desember 2025.

2.2.2. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di beberapa tempat. Proses pembuatan simplisia dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Pembuatan ekstrak kulit batang kelor dilakukan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Proses identifikasi metabolit sekunder ekstrak kulit batang kelor dilakukan di Laboratorium Kimia Terpadu, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin dan Laboratorium Terpadu Teknik Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang. Prosedur uji *in silico* dilakukan di perangkat komputer peneliti. Prosedur uji *in vitro* dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

2.3. Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel Penelitian

2.3.1. Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian eksperimental ini adalah spesies *Moringa oleifera L.* yang berasal dari *Green House*, Fakultas Pertanian Universitas Hasanuddin, Provinsi Sulawesi Selatan, Indonesia. Tanaman ini diidentifikasi dan autentikasi oleh ahli tanaman Fakultas Pertanian Universitas Hasanuddin. Sedangkan sampel penelitian pada uji *in silico* merupakan struktur SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) senyawa metabolit sekunder kulit batang kelor dari hasil identifikasi dengan FTIR dan GC-MS yang diambil dari basis data PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.3.2. Subjek Penelitian

Subjek pada uji *in vitro* adalah *cell line* kanker payudara MCF-7 (ATCC® HTB-22™) yang diperoleh dari kultur sel yang tersedia di Laboratorium Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Sedangkan, subjek penelitian pada uji *in silico* adalah protein target yang terkait dengan kanker payudara subtipe *Luminal A* yang diperoleh dari basis data *GeneCards* (<https://www.genecards.org/>) dan *OpenTargets* (<https://www.opentargets.org/>).

2.4. Instrumen Penelitian.

2.4.1. Alat dan Bahan Prosedur Uji Kandungan.

Tabel 3. Alat dan Bahan Prosedur Maserasi Sampel dan Uji Kandungan

No.	Alat	Fungsi/Kegunaan
1	Pisau / gunting laboratorium	Memotong kulit batang kelor menjadi bagian kecil sebelum pengeringan
2	Wadah saringan / nampan	Menampung bahan tanaman saat proses penirisan dan pengeringan
3	Kertas label + spidol	Menandai sampel dan wadah
4	Grinder / blender kering	Menghaluskan kulit batang kelor kering menjadi serbuk
5	<i>Erlenmeyer</i> 1000 mL	Wadah untuk proses maserasi (perendaman serbuk dengan pelarut)
6	Aluminium foil / parafilm	Menutup <i>Erlenmeyer</i> selama proses maserasi agar terhindar dari kontaminasi
7	Kertas saring Whatman no. 1	Menyaring campuran ekstraksi untuk memisahkan filtrat dan residu
8	Corong kaca	Membantu proses penyaringan
9	<i>Rotary evaporator</i>	Menguapkan pelarut (etanol) dari larutan ekstrak hingga tersisa ekstrak kental
10	<i>Water bath</i> / penangas air	Mendukung <i>rotary evaporator</i> untuk menjaga suhu evaporasi stabil (45–50°C)
11	Timbangan digital	Menimbang serbuk kelor secara presisi (300 gram)
12	<i>Beaker glass</i> / tabung ukur	Untuk mengukur volume pelarut dan melarutkan ekstrak sebelum aplikasi perlakuan
13	Botol ekstrak berpenutup / vial	Menyimpan ekstrak hasil evaporasi dalam bentuk pasta
14	Pipet tetes / <i>mikropipet</i>	Mengambil ekstrak untuk pengenceran atau perlakuan
15	Sendok laboratorium spatula	Mengambil serbuk tanaman dan pasta ekstrak
16	Mortar dan alu	Menghaluskan dan mencampur ekstrak dengan KBr (uji FTIR)
17	Pellet press (<i>Hydraulic Press</i>)	Membuat pellet transparan dari campuran KBr dan ekstrak
18	Desikator	Menyimpan pellet agar tetap kering sebelum dianalisis
19	FTIR <i>Spectrometer</i>	Menghasilkan spektrum inframerah dari sampel ekstrak
20	Komputer dan <i>software</i> FTIR	Mengontrol alat dan menganalisis spektrum
21	<i>Gas Chromatography–Mass Spectrometry</i> (GC-MS)	Menganalisis profil senyawa volatil dalam ekstrak
22	<i>Syringe GC (mikrosiringa)</i>	Menyuntikkan sampel ke dalam sistem GC-MS
23	<i>Gas carrier</i> (He/N ₂)	Sebagai fase gerak pada sistem GC-MS
24	Kolom kapiler (misal: DB-5MS)	Memisahkan komponen senyawa berdasarkan polaritas dan volatil
25	Komputer dan <i>software</i> GC-MS	Mengolah data kromatogram dan spektrum massa
No.	Bahan	Fungsi/Kegunaan

1	Simplisia dan Ekstrak Etanol Kulit Batang Kelor	Bahan utama untuk proses ekstraksi
2	Etanol 70% (teknis/analitik)	Pelarut untuk mengekstraksi senyawa bioaktif melalui maserasi
3	Aquades steril	Digunakan untuk melarutkan ekstrak pasta ke dalam konsentrasi yang diinginkan
4	Kertas label dan lemari kering	Mendukung proses identifikasi dan penyimpanan bahan
5	Kalium bromida (KBr) murni	Media pembawa dalam pembuatan pellet FTIR
6	Etanol/methanol (uji FTIR/GC-MS)	Pelarut ekstrak, mudah menguap sebelum analisis
7	Gas helium/nitrogen (<i>carrier gas</i>)	Fase gerak untuk pemisahan senyawa di GC

(Maria & Nay, 2023) (Waterman, 1993)(Lay et al., 2022)(Ikalinus et al., 2015)(Sarjito et al., 2020)(Smith, 2011).

2.4.2. Alat dan Bahan Uji *In silico*

Seluruh analisis *in silico* pada penelitian ini dilakukan menggunakan perangkat komputer yang dilengkapi dengan prosesor *Intel® Pentium® Silver N6000* (1,10 GHz), memori RAM 8 GB, serta sistem operasi Windows 64-bit. Konfigurasi perangkat keras ini memberikan kemampuan komputasi yang memadai untuk menjalankan analisis bioinformatika terkait.

2.4.3. Alat dan Bahan Uji *In vitro*

Tabel 4. Alat dan Bahan Prosedur Kultur Sel dan Prosedur Uji Sitotoksik MTT

No.	Alat	Fungsi/Kegunaan
1	<i>Biosafety Cabinet</i> (BSC)	Menyediakan lingkungan steril untuk manipulasi sel dan mencegah kontaminasi
2	Inkubator CO ₂ 5%	Menjaga suhu dan kadar CO ₂ optimal (37°C, 5% CO ₂) untuk pertumbuhan sel mamalia
3	Tabung Gas CO ₂	Menyediakan suplai CO ₂ ke dalam inkubator untuk mempertahankan pH media
4	Mikroskop <i>Inverted</i>	Mengamati morfologi, kepadatan, dan pelekatan sel pada dasar flask atau plate
5	Hemositometer / <i>Cell counter</i>	Menghitung jumlah sel secara manual menggunakan pewarnaan Trypan Blue
6	Sentrifus	Memisahkan sel dari supernatan setelah pemanenan atau pencucian
7	Pipet otomatis (<i>mikropipet</i>)	Untuk mengambil dan memindahkan cairan secara presisi selama manipulasi sel
8	<i>Multichannel pipet</i>	Mempercepat pipetasi larutan pada 96-well plate untuk perlakuan massal
8	Tabung konikal (15 mL)	Menampung sel hasil panen dan digunakan dalam proses sentrifugasi
9	<i>Multiwell Plate</i> (6/96 well)	Wadah kultur untuk penanaman sel dalam uji perlakuan
10	<i>ELISA reader</i> (570–595 nm)	Mengukur absorbansi larutan formazan hasil uji MTT
11	<i>Timer/ Stopwatch</i>	Mengontrol durasi inkubasi selama tahapan prosedur

No.	Bahan	Fungsi/Kegunaan
12	Erlenmeyer steril	Menampung cairan kultur atau limbah selama proses
1	Sel MCF-7	Sel kanker payudara manusia yang digunakan sebagai model uji <i>in vitro</i>
2	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Medium dasar untuk pertumbuhan sel mamalia
3	FBS (Fetal Bovine Serum) 10%	Suplemen media untuk menyediakan faktor pertumbuhan sel
4	Penisilin/Streptomisin	Antibiotik untuk mencegah kontaminasi bakteri selama kultur
5	Amfoterisin B	Antijamur untuk mencegah kontaminasi fungi pada media kultur
6	PBS (Phosphate Buffered Saline)	Digunakan untuk mencuci sel sebelum panen atau perlakuan
7	Tryple Select	Enzim alternatif tripsin untuk memisahkan sel dari permukaan flask
8	Trypan Blue	Pewarna untuk menghitung jumlah sel hidup dan mati
9	Etanol 70%	Antiseptik untuk sterilisasi permukaan alat dan ruang kerja
10	Aquabidest steril	Digunakan sebagai pelarut atau pembilas dalam prosedur kultur
11	DMSO / SDS 10% dalam HCl 0,01N	Pelarut kristal formazan sebelum pengukuran absorbansi
12	Ekstrak kulit batang kelor	Bahan uji utama terhadap sel MCF-7 dalam uji sitotoksik
13	MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida)	Indikator metabolisme sel yang berubah menjadi formazan oleh sel hidup

(Yustisia, 2024)(Yustisia et al., 2025)

2.5. Prosedur Penelitian

2.5.1. Prosedur Uji Kandungan

2.5.1.1. Persiapan Sampel

Sampel kulit batang kelor (*Moringa oleifera L.*) sebanyak ± 7 kg diperoleh dari *Green House*, Fakultas Pertanian Universitas Hasanuddin. Sampel dibersihkan menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran dan debu yang menempel, kemudian ditiriskan dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama 24 jam. Setelah itu, kulit batang dipotong menjadi bagian-bagian kecil dengan ukuran yang relatif seragam guna mempercepat proses pengeringan lanjutan, lalu dijemur selama 8 jam per hari selama dua hari hingga mencapai kadar air rendah. Bahan kering kemudian dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk, selanjutnya diayak menggunakan ayakan *mesh-40* untuk memperoleh ukuran partikel yang seragam dan homogen. Serbuk halus kulit batang kelor yang dihasilkan digunakan sebagai *simplisia* pada tahap ekstraksi serta analisis uji kandungan selanjutnya.

2.5.1.2. Ekstraksi Sampel dengan Maserasi

Ekstraksi senyawa bioaktif dari serbuk *simplisia* kulit batang kelor dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% (Wang et al., 2020). Metode ini dipilih karena bersifat sederhana, tidak melibatkan pemanasan langsung, serta efektif dalam mengekstraksi senyawa polar hingga semi-polar tanpa merusak struktur senyawa bioaktif yang sensitif terhadap suhu tinggi. Sebanyak 500 gram serbuk *simplisia* kulit batang kelor hasil pengayakan dimasukkan ke dalam wadah maserasi, kemudian ditambahkan pelarut etanol 70% dengan perbandingan bahan dan pelarut 1:10 (b/v), yaitu sebanyak 5 liter pelarut. Campuran tersebut direndam selama 3×24 jam pada suhu ruang sambil sesekali diaduk untuk mempercepat proses difusi senyawa aktif ke dalam pelarut. Setelah perendaman selesai, campuran disaring menggunakan kertas saring (*Whatman* No.1) untuk memisahkan filtrat dan ampas. Ampas kemudian dimaserasi ulang sebanyak dua kali dengan prosedur yang sama untuk memastikan senyawa aktif terekstraksi secara maksimal. Semua filtrat hasil maserasi digabungkan, lalu diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40-50°C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental kulit batang kelor tersebut kemudian disimpan dalam wadah gelap tertutup rapat dan diletakkan pada suhu rendah hingga siap digunakan untuk analisis uji kandungan dan uji aktivitas biologis lebih lanjut.

2.5.1.3. Analisis Gugus Fungsi dengan FTIR

Spektroskopi Fourier Transform Infrared (FTIR) merupakan metode yang umum digunakan dalam studi fitokimia sebagai pendekatan awal untuk mengidentifikasi gugus fungsi dominan pada ekstrak tanaman dan memahami karakteristik kimia metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya. FTIR tidak dimaksudkan untuk mengidentifikasi senyawa secara individual, melainkan memberikan informasi struktural mengenai kelas senyawa berdasarkan vibrasi ikatan kimia yang terdeteksi pada spektrum inframerah. Pada penelitian ini, analisis dilakukan untuk mengidentifikasi gugus fungsi yang terdapat pada kulit batang kelor, baik dalam bentuk *simplisia* maupun ekstrak etanol 70%. Pengukuran FTIR dilakukan menggunakan spektrometer *Shimadzu IRTracer-100* dengan metode *Attenuated Total Reflection* (ATR). Sebanyak 1 gram serbuk *simplisia* halus dan 1 gram ekstrak kental yang telah dikeringkan selama 24 jam masing-masing ditempatkan langsung pada kristal ATR tanpa pencampuran dengan KBr. Sampel dipindai pada rentang bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1} , yang merupakan rentang umum untuk identifikasi gugus fungsi senyawa organik. Spektrum inframerah yang dihasilkan menunjukkan pita serapan khas dari berbagai gugus fungsi, yang mencerminkan keberadaan senyawa-senyawa bioaktif dalam sampel. Nilai puncak serapan (*peak*) yang terdeteksi dicatat dan disimpan dalam format *.txt*, kemudian dianalisis untuk mengidentifikasi serta membandingkan perbedaan gugus fungsi antara *simplisia* dan ekstrak hasil maserasi.

2.5.1.4. Identifikasi Senyawa Bioaktif dengan GC-MS

Identifikasi senyawa bioaktif dalam ekstrak kulit batang kelor dilakukan menggunakan instrumen *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) *Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra* di Laboratorium Kromatografi Politeknik Negeri Ujung Pandang,

Makassar. Analisis ini bertujuan untuk menentukan komponen kimia penyusun ekstrak secara kualitatif berdasarkan waktu retensi dan spektrum massa.

Sebanyak 2gram ekstrak kental dilarutkan dalam etanol 70% hingga homogen, kemudian disaring untuk memperoleh filtrat jernih. Filtrat selanjutnya dimasukkan ke dalam vial sampel dan dianalisis menggunakan GC-MS. Kondisi operasi GC-MS meliputi suhu awal kolom 50°C yang dipertahankan selama 3 menit, kemudian dinaikkan secara bertahap hingga 300°C dengan laju 5°C per menit, dan ditahan selama 10 menit pada suhu akhir. Gas pembawa yang digunakan adalah helium (He) dengan laju alir konstan sebesar 1 mL/menit.

Ionisasi dilakukan menggunakan metode *Electron Ionization* (EI) dengan energi 70 eV, serta kisaran massa yang dipindai berada pada rentang m/z 35–500. Spektrum massa yang diperoleh dibandingkan dengan pustaka spektrum dalam database NIST 20.0 (*National Institute of Standards and Technology*), dengan kriteria tingkat kemiripan (*similarity index*) $\geq 85\%$. Analisis dilakukan dalam tiga kali ulangan, dan kelimpahan relatif setiap senyawa ditentukan berdasarkan normalisasi luas puncak kromatogram.

2.5.2. Prosedur Uji *In silico*

Prosedur uji *in silico* diawali dengan identifikasi senyawa bioaktif dari ekstrak etanol kulit batang kelor (*Moringa oleifera* L.) melalui analisis GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*). Senyawa-senyawa terpilih ditentukan berdasarkan dominansi dan potensi aktivitas antikanker, kemudian struktur kimianya diverifikasi melalui basis data PubChem dalam format SMILES. Aktivitas biologis masing-masing senyawa diprediksi menggunakan *PASSOnline*, sedangkan penentuan target molekuler dilakukan dengan *SwissTargetPrediction*. Target protein yang berhubungan dengan kanker payudara subtipe *Luminal A* diperoleh dari basis data *OpenTargets* dan *GeneCards*, kemudian dilakukan *overlapping* dengan target senyawa untuk memperoleh protein target bersama. Selanjutnya, interaksi antarprotein dianalisis menggunakan STRING database dan divisualisasikan melalui *Cytoscape* untuk menentukan *core targets* berdasarkan parameter topologi jaringan. Identifikasi kluster fungsional dilakukan menggunakan *plugin* MCODE, dan hasil analisis topologi jaringan dan MCODE digunakan untuk menentukan protein target utama.

2.5.2.1. Identifikasi Senyawa Bioaktif Kulit Batang Kelor

Tahap pertama uji *in silico* dimulai dengan identifikasi senyawa bioaktif dari ekstrak etanol kulit batang kelor (*Moringa oleifera* L.). Identifikasi dilakukan berdasarkan hasil uji eksperimental *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) yang memberikan profil komposisi kimia ekstrak. Data spektrum digunakan untuk menentukan jenis senyawa yang terkandung dalam ekstrak berdasarkan waktu retensi (*retention time*) dan pola fragmentasi massa, yang kemudian dibandingkan dengan pustaka NIST (*National Institute of Standards and Technology*) untuk memastikan identitas senyawa. Dari hasil analisis tersebut, diperoleh sejumlah senyawa bioaktif yang beragam, beberapa senyawa dengan persentase area tertinggi dipilih sebagai senyawa dominan untuk dianalisis lebih lanjut.

Informasi kimia dari setiap senyawa, termasuk nama, rumus molekul, berat molekul, dan struktur kimia 2D diperoleh dan diverifikasi melalui basis data PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) Basis data ini digunakan untuk memastikan kesesuaian struktur serta memperoleh representasi SMILES dari masing-masing senyawa. Data SMILES tersebut kemudian digunakan sebagai input dalam tahap lanjutan penelitian, meliputi prediksi bioaktivitas, uji ADMET (*Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity*), serta prediksi target protein guna mengevaluasi potensi senyawa bioaktif dari ekstrak kulit batang kelor sebagai kandidat antikanker.

2.5.2.2. Uji ADMET Senyawa (*Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity*)

Uji ADMET (*Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity*) dilakukan secara *in silico* untuk memprediksi karakteristik farmakokinetik dan toksikologi dari senyawa bioaktif yang teridentifikasi pada ekstrak etanol kulit batang kelor (*Moringa oleifera L.*). Analisis bertujuan untuk menilai potensi farmakologis dan keamanan senyawa sebelum dilakukan pengujian biologis lanjutan (L. Fu et al., 2024).

Prediksi dilakukan menggunakan ADMETLab 3.0 yang dapat diakses melalui laman <https://admetmesh.scbdd.com/service/screening/molecule>. Struktur kimia senyawa dominan hasil analisis dimasukkan ke dalam sistem ADMETLab dalam format SMILES. Format SMILES di peroleh dari basis data PubChem untuk memastikan akurasi representasi struktur kimia (L. Fu et al., 2024; Samdani et al., 2023).

Server ADMETLab 3.0 bekerja berdasarkan algoritma *Quantitative Structure-Property Relationship* (QSPR) yang dikembangkan dengan kerangka *Multi-task Graph Attention* (MGA) dan dilatih menggunakan data ADMET eksperimental berskala besar (Xiong et al., 2021)(L. Fu et al., 2024). Sistem ini secara otomatis mengevaluasi parameter farmakokinetik dan toksikologi senyawa, meliputi:

1. *Absorption* (Penyerapan): meliputi prediksi penyerapan gastrointestinal dan permeabilitas membran.
2. *Distribution* (Distribusi): meliputi prediksi volume distribusi, penetrasi sawar darah otak (*blood-brain barrier*, BBB), dan ikatan terhadap protein plasma.
3. *Metabolism* (Metabolisme): meliputi prediksi potensi interaksi dengan enzim sitokrom P450 (CYP450) yang berperan dalam metabolisme obat.
4. *Excretion* (Ekskresi): meliputi prediksi laju eliminasi dan ekskresi renal.
5. *Toxicity* (Toksitas): mencakup prediksi *human hepatotoxicity (H-HT)*, *drug-induced liver injury (DILI)*, serta potensi karsinogenik dan toksitas sistemik lainnya.

Selain itu, hasil evaluasi juga mempertimbangkan aturan *Lipinski (Rule of Five)* sebagai indikator kelayakan senyawa untuk aktivitas oral, yaitu berat molekul ≤ 500 Dalton, nilai $\log P \leq 5$, jumlah donor hidrogen ≤ 5 , dan jumlah akseptor hidrogen ≤ 10 . Senyawa yang memenuhi parameter ini dikategorikan memiliki karakteristik farmakokinetik yang baik dan potensi tinggi sebagai kandidat obat (Xiong et al., 2021)(L. Fu et al., 2024).

Seluruh hasil prediksi dari ADMET diekspor dalam bentuk tabel dan dianalisis secara deskriptif, guna menentukan profil farmakokinetik dan toksikologi awal dari masing-masing senyawa bioaktif yang teridentifikasi dalam ekstrak etanol kulit batang

kelor. Data ini digunakan sebagai dasar seleksi senyawa yang layak untuk dianalisis lebih lanjut pada tahap prediksi bioaktivitas dan penentuan target protein.

2.5.2.3. Prediksi Bioaktivitas Senyawa

Prediksi bioaktivitas senyawa bioaktif dari ekstrak etanol kulit batang kelor (*Moringa oleifera* L.) dilakukan secara *in silico* menggunakan webserver *Way2Drug PASS Online* (<https://www.way2drug.com/PASSOnline/>). Senyawa yang dianalisis merupakan senyawa hasil identifikasi GC-MS yang telah diverifikasi strukturnya melalui basis data PubChem serta memenuhi kriteria farmakokinetik dan toksikologi berdasarkan analisis ADMET, khususnya *Lipinski's Rule of Five* (Filimonov et al., 2020).

Metode PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) memprediksi spektrum aktivitas biologis senyawa berdasarkan struktur kimianya. Hasil prediksi dinyatakan dalam dua parameter utama, yaitu Pa (*probability of being active*) dan Pi (*probability of being inactive*) dengan nilai antara 0 hingga 1. Nilai Pa yang lebih tinggi menunjukkan probabilitas aktivitas biologis yang lebih besar. Dalam penelitian ini, senyawa dengan nilai Pa yang berkaitan dengan aktivitas antikanker diprioritaskan untuk analisis lanjutan. Hasil prediksi bioaktivitas diekspor dalam bentuk tabel dan grafik untuk dianalisis secara deskriptif untuk menentukan potensi aktivitas biologis relatif dari masing-masing senyawa khususnya terkait aktivitas antikanker

2.5.2.4. Prediksi dan Identifikasi Target Protein Senyawa Bioaktif pada Kanker Payudara Luminal A

Prediksi target protein potensial dari senyawa bioaktif ekstrak etanol kulit batang kelor (*Moringa oleifera* L.) dilakukan secara *in silico* menggunakan platform *SwissTargetPrediction* (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) untuk mengidentifikasi kemungkinan interaksi antara senyawa hasil analisis GC-MS dan protein target manusia yang berperan dalam aktivitas biologis (Daina et al., 2019). Senyawa dominan dimasukkan ke dalam sistem dalam format SMILES kemudian dianalisis berdasarkan kemiripan struktur kimia dengan *ligan* yang telah memiliki aktivitas biologis terdokumentasi dalam basis data. Hasil prediksi dinyatakan sebagai nilai probabilitas interaksi antara senyawa dan protein target, di mana senyawa dengan probabilitas > 0 dipilih untuk analisis lebih lanjut.

Identifikasi target protein yang relevan dengan kanker payudara subtipe *luminal A* dilakukan secara *in silico* menggunakan basis data *GeneCards* (<https://www.genecards.org/>) dan *OpenTargets* (<https://www.opentargets.org/>) yang menyediakan data terintegrasi berbasis bukti genetik, transkriptomik, proteomik, serta data eksperimental dan klinis. Pencarian dilakukan menggunakan kata kunci "*breast cancer luminal A*" untuk memperoleh daftar gen dan protein yang terlibat secara spesifik pada subtipe *luminal A*, yang secara biologis merepresentasikan model sel kanker payudara MCF-7 (Buniello et al., 2025; Safran et al., 2021).

Selanjutnya, dilakukan pemetaan irisan antara target protein hasil prediksi *SwissTargetPrediction* dan target protein terkait dengan kanker payudara subtipe *luminal A*. Target hasil irisan tersebut dianggap sebagai target biologis potensial dari senyawa bioaktif ekstrak kulit batang kelor terhadap kanker payudara luminal A, dan digunakan sebagai dasar analisis jaringan interaksi protein–protein (*protein-protein interaction*, PPI)

dalam pendekatan *network pharmacology* untuk mengidentifikasi protein kunci yang berperan dalam mekanisme antikanker (Daina et al., 2019).

2.5.2.5. Analisis Interaksi Antarprotein

Analisis *network pharmacology* digunakan untuk mengeksplorasi *mechanism of action* (MoA) senyawa bioaktif ekstrak etanolik kulit batang kelor melalui interaksi multiprotein dalam jaringan biologis yang kompleks. Pendekatan ini dilakukan untuk mengintegrasikan target protein hasil prediksi senyawa bioaktif dengan target protein yang berasosiasi dengan kanker payudara subtipe *Luminal A*, guna mengidentifikasi protein yang memiliki keterkaitan paling kuat dalam jaringan molekuler. Analisis *network pharmacology* dilakukan untuk mengevaluasi interaksi antarprotein dan mengidentifikasi protein kunci (*hub genes*) yang berperan dalam aktivitas antikanker ekstrak etanol kulit batang kelor. Pendekatan ini didasarkan pada konsep bahwa kanker payudara merupakan penyakit kompleks yang melibatkan disfungsi jaringan regulasi biologis multiprotein, sehingga mekanisme terapinya tidak hanya bergantung pada satu target tunggal, melainkan pada modulasi jaringan molekuler secara simultan (M. Hu et al., 2023; Szklarczyk et al., 2023).

Analisis diawali dengan penentuan gen target hasil irisan antara target senyawa (*SwissTargetPrediction*) dan gen terkait kanker payudara *luminal A* (*GeneCards* dan *OpenTargets*). Kumpulan target tersebut dibandingkan menggunakan *Venn diagram webtool* (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) (Bardou et al., 2014). Gen hasil irisan tersebut kemudian dimasukkan ke dalam basis data STRING (<https://string-db.org/>) (v12.0; *high-confidence score* ≥ 0.7 ; *Homo sapiens*) untuk membangun jaringan interaksi protein-protein, yang selanjutnya divisualisasikan dan menggunakan *Cytoscape* (v3.10.4; *Institute for Systems Biology*, Seattle, WA, USA) (Paul Shannon et al., 1971).

Dalam jaringan PPI, setiap protein direpresentasikan sebagai *node*, sedangkan interaksi antarprotein direpresentasikan sebagai *edge*. Analisis dilakukan dengan tiga parameter utama:

- *Degree* → menunjukkan jumlah koneksi langsung dengan protein lain; nilai tinggi menandakan simpul penting.
- *Betweenness centrality* → menunjukkan peran protein sebagai penghubung utama dalam aliran informasi jaringan.
- *Closeness centrality* → menunjukkan efisiensi interaksi protein dengan seluruh jaringan.

Protein dengan nilai *degree* ≥ 3 , *betweenness* $\geq 0,1$, dan *closeness* $\geq 0,5$ dianggap berperan sentral dalam sistem, sehingga diprioritaskan sebagai target potensial. Selain itu, analisis modul fungsional dilakukan menggunakan algoritma MCODE (v2.0.3) dengan parameter: *degree cutoff* = 2, *node score cutoff* = 0.2, *K-core* = 2, dan *maximum depth* = 100 untuk mengidentifikasi kluster protein dengan tingkat konektivitas tinggi. (Hogue & Groll, 2001). Identifikasi *hub genes* dan modul fungsional ini menjadi dasar untuk interpretasi biologis lebih lanjut dalam menjelaskan peran protein kunci dan jaringan molekuler yang terlibat dalam potensi aktivitas antikanker ekstrak kulit batang kelor terhadap kanker payudara subtipe *luminal A*.

2.5.2.6. Analisis Pathway Enrichment dan Validasi Ekspresi Gen

Setelah *gen hub* ditetapkan melalui analisis topologi jejaring pada tahap *network pharmacology*, dilakukan evaluasi jalur biologis dan relevansi ekspresi gen untuk memahami peran fungsional gen-gen kunci tersebut dalam kanker payudara subtipe *luminal A*. Analisis *pathway enrichment* dilakukan menggunakan DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) *Bioinformatics Resources* (versi 2024Q1; <https://david.ncifcrf.gov/>) untuk mengidentifikasi jalur pensinyalan biologis yang berpotensi menjadi mekanisme utama aktivitas antikanker kulit batang kelor. Anotasi jalur dilakukan berdasarkan basis data *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) untuk memetakan keterlibatan *gen hub* dalam proses biologis dan jalur pensinyalan yang relevan dengan kanker payudara *luminal A*. Signifikansi statistik jalur dihitung menggunakan *hypergeometric test* dengan koreksi *false discovery rate* (FDR) metode Benjamini–Hochberg. Jalur dianggap signifikan apabila memenuhi kriteria $FDR < 0,05$ dan melibatkan sedikitnya dua gen. Jalur-jalur teratas yang memenuhi kriteria tersebut kemudian dipilih untuk divisualisasikan dan dianalisis lebih lanjut. (Sherman et al., 2022).

Selanjutnya, dilakukan validasi ekspresi *gen hub* untuk memastikan relevansi biologis target hasil analisis jejaring. Profil ekspresi gen dianalisis menggunakan platform UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/>) berdasarkan dataset transkriptomik TCGA-BRCA. Tingkat ekspresi mRNA (dinyatakan dalam *transcripts per million*, TPM) dari *gen hub* dibandingkan antara sampel kanker payudara subtipe *luminal A* ($n = 566$) dan jaringan payudara normal ($n = 114$). Analisis statistik dilakukan menggunakan *Student's t-test* dua ekor dengan kriteria signifikansi $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1,0$ dan $p < 0,05$. Gen yang memenuhi kriteria tersebut dianggap memiliki perubahan ekspresi yang signifikan dan relevan secara biologis, sehingga diprioritaskan sebagai kandidat target terapeutik potensial dari senyawa bioaktif ekstrak kulit batang kelor (Chandrashekar et al., 2022).

2.5.3. Prosedur Uji *In vitro*

Prosedur uji *in vitro* pada penelitian ini mengacu pada Panduan Praktikum Teknik Dasar Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler, Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin. Kultur sel dilakukan untuk menumbuhkan dan mempertahankan viabilitas sel kanker payudara MCF-7 sebelum diberikan perlakuan uji. Kultur sel merupakan tahap fundamental dalam penelitian biomedik yang bertujuan untuk menumbuhkan dan mempertahankan viabilitas sel dalam kondisi *in vitro* sebelum diberikan perlakuan (Yustisia, 2024)(Yustisia et al., 2025).

2.5.3.1. Prosedur Kultur Sel MCF-7

1. Penanaman Sel: Sel MCF-7 dikultur dalam pelat 96 sumur dengan kepadatan 5×10^4 sel/sumur dalam medium DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) yang telah disuplementasi dengan 10% FBS, 1% penisilin-streptomisin, sebagai medium dasar untuk menunjang pertumbuhan optimal dan mencegah kontaminasi.

2. Inkubasi Awal: Sel diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C dan 5% CO₂ untuk memastikan keterikatan dan adaptasi sel dalam medium.

2.5.3.2. Prosedur Uji Sitotoksitas

Untuk mengevaluasi efek sitotoksik dari ekstrak etanolik kulit batang kelor (*Moringa oleifera* L.) terhadap sel kanker payudara MCF-7, dilakukan uji MTT *in vitro* dengan tahapan sebagai berikut:

1. Perlakuan Senyawa: Setelah inkubasi awal selama 24 jam, ke dalam medium ditambahkan ekstrak etanolik kulit batang kelor dengan berbagai konsentrasi, yaitu: a) Kelompok kontrol: sel tanpa penambahan ekstrak b) Kelompok perlakuan: sel dengan penambahan ekstrak etanolik kulit batang kelor pada konsentrasi 3,90625; 7,8125; 15,625; 31,25; 62,5; 125; dan 250 µg/mL (total 7 kelompok perlakuan). Sel kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37 °C dan 5% CO₂.
2. Uji MTT: Setelah inkubasi 24 jam, ditambahkan larutan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida) ke setiap sumur hingga mencapai konsentrasi akhir 0,5 mg/mL, dan diinkubasi selama 2-4 jam dalam 5% CO₂ pada suhu 37 °C.
3. Pelarutan Kristal Formazan: Setelah inkubasi, ditambahkan larutan SDS 10% dalam HCl 0,01 N ke setiap sumur untuk melarutkan kristal formazan ungu yang terbentuk dari sel hidup, kemudian diinkubasi semalam.
4. Pembacaan Absorbansi dan Penentuan Viabilitas Sel: Absorbansi diukur pada panjang gelombang 595 nm menggunakan *ELISA reader*. Viabilitas sel dihitung dengan membandingkan absorbansi kelompok perlakuan terhadap kelompok kontrol menggunakan rumus: viabilitas sel = (absorbansi perlakuan/absorbansi kontrol) × 100%. Nilai IC₅₀ dapat ditentukan dari kurva dosis-respons untuk mengetahui konsentrasi ekstrak yang menyebabkan 50% kematian sel MCF-7.

2.6. Analisis Data

Data yang diperoleh dari uji fitokimia, uji sitotoksitas, dan analisis *in silico* dianalisis secara deskriptif, statistik, dan komputasional untuk memperoleh gambaran menyeluruh mengenai kandungan bioaktif serta potensi aktivitas antikanker ekstrak etanol kulit batang kelor (*Moringa oleifera* L.).

Analisis statistik uji *in vitro* dilakukan menggunakan *GraphPad Prism version 10.6.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)*. Uji normalitas dilakukan menggunakan *Shapiro-Wilk* dan *Kolmogorov-Smirnov*, sedangkan *homogenitas varians* diuji menggunakan *Brown-Forsythe test*. Perbedaan antar kelompok perlakuan dianalisis menggunakan *One-way ANOVA*, diikuti *Tukey's multiple comparison post-hoc test*, dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$. Kurva dosis-respon dan nilai IC₅₀ dihitung menggunakan model *nonlinear regression four-parameter logistic (4PL)*, serta kualitas kecocokan model dievaluasi berdasarkan nilai koefisien determinasi (R²).

Analisis *in silico* dilakukan untuk memprediksi protein target dari senyawa bioaktif menggunakan basis data *SwissTargetPrediction*. Data protein target yang diperoleh dianalisis secara fungsional melalui *Gene Ontology (GO)* dan *KEGG Pathway Enrichment Analysis* untuk menentukan keterkaitannya dengan aktivitas antikanker.

Analisis *network pharmacology* dan *enrichment* dilakukan menggunakan berbagai platform berbasis web sesuai parameter teknis yang dijelaskan pada subheading 2.5.2.4-2.5.2.6. Validasi ekspresi gen dilakukan menggunakan platform UALCAN berbasis dataset TCGA, untuk membandingkan tingkat ekspresi *hub genes* pada jaringan kanker payudara luminal A dengan jaringan normal.

2.7. Izin Penelitian dan Kelayakan Etik

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin dengan nomor surat 487A/UN4.6.4.5.31/ PP36/ 2025 dan nomor protokol UH25060437.