



Cytotoxic Activity of Ethyl Acetate Fraction *Moringa oleifera* Leaves and Its Effect on Apoptosis Induction Against T47D Breast Cancer Cell Line

Riza Apriani¹, Shabarni Gaffar², Tati Herlina²

¹Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Garut

²Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadajran

Corresponding author: Riza Apriani (aprianiriza@uniga.ac.id)

ARTICLE HISTORY

Received: 20 November 2018

Revised: 12 December 2018

Accepted: 15 January 2019

Abstract

Moringa oleifera is one of plant that has been widely used in traditional medicine industry. Several studies have reported that *M. oleifera* leaf extract has antiproliferative activity in several cancer cells, including HepG2 liver cancer cells, A549 lung cancer cells, Caco-2 colon cancer cells and MDA-MB-231 breast cancer cells, but studies on T47D breast cancer cells have not reported yet. Therefore, this study aimed to determine the anticancer activity of *M. oleifera* leaves on T47D breast cancer cells. *M. oleifera* leaves extract was obtained by extraction using ethanol then fractionated with *n*-hexane and ethyl acetate. Cytotoxic activity was determined under MTT assay. Apoptosis induction was performed using Annexin V-PI staining method and analyzed by flow cytometry. Molecular study was also carried out through observation of regulatory apoptotic protein, namely Bcl-2 by immunocytochemistry method. Based on the result, T47D cells treated with ethyl acetate fraction of *M. oleifera* leaves showed medium activity as an anticancer with IC₅₀ values of 243.58 µg/mL. Detection of apoptosis showed that ethyl acetate fraction of *M. oleifera* leaves induced apoptosis. Immunocytochemistry observations showed that ethyl acetate fraction of *M. oleifera* leaves decreased expression of Bcl-2 protein.

Key words: Apoptosis, Breast cancer, *Moringa oleifera*, T47D cell

Aktivitas Sitotoksik Fraksi Etil Asetat Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) dan pengaruhnya Terhadap Induksi Apoptosis Pada Sel Kanker Payudara T47D

Abstrak

Tanaman kelor (*Moringa oleifera*) adalah salah satu tanaman yang telah banyak digunakan dalam industri pengobatan tradisional. Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa ekstrak daun *M. oleifera* memiliki aktivitas antiproliferatif pada beberapa sel kanker, di antaranya terhadap sel kanker hati HepG2, sel kanker paru A549, sel kanker kolon Caco-2 dan sel kanker payudara MDA-MB-231, namun penelitian terhadap sel kanker payudara T47D belum dilakukan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antikanker daun *M. oleifera* terhadap sel kanker payudara T47D. Ekstrak daun *M. oleifera* diperoleh dengan cara ekstraksi menggunakan pelarut etanol, kemudian difraksionasi dengan pelarut *n*-heksana dan etil asetat. Uji sitotoksik yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan metode MTT assay. Pengujian terhadap induksi apoptosis dilakukan dengan metode pewarnaan Annexin V-PI dan dianalisis dengan *flow cytometry*. Kajian molekular juga dilakukan melalui pengamatan protein regulator apoptosis, yaitu Bcl-2 dengan metode imunositokimia. Berdasarkan hasil dari MTT assay, sel T47D yang diberi perlakuan dengan fraksi etil asetat daun *M. oleifera* menunjukkan aktivitas medium sebagai antikanker dengan nilai IC₅₀ sebesar 243,58 µg/mL. Pengujian terhadap apoptosis menunjukkan bahwa fraksi etil asetat daun *M. oleifera* dapat menginduksi apoptosis. Hasil pengamatan dengan imunositokimia menunjukkan bahwa pemberian fraksi etil asetat daun *M. oleifera* mampu menurunkan ekspresi protein Bcl-2.

Kata kunci: Apoptosis, *Moringa oleifera*, kanker payudara, sel T47D

Pendahuluan

Kanker merupakan salah satu penyakit yang menyebabkan angka kematian cukup tinggi di Indonesia maupun di dunia. Kanker merupakan pertumbuhan dan perkembangan sel yang tidak terkontrol yang terjadi di dalam tubuh. Insidensi berbagai jenis kanker mengalami peningkatan di negara-negara berkembang¹. Kanker payudara menduduki peringkat pertama kasus kanker dan menjadi penyebab kematian akibat kanker yang paling banyak diderita oleh wanita di seluruh dunia². Perkembangan kanker seringkali dijumpai sudah dalam stadium lanjut (metastatis) dan melibatkan mekanisme molekuler yang kompleks sehingga menimbulkan masalah dalam terapinya³.

Pengobatan kanker payudara dengan cara kemoterapi merupakan pilihan potensial yang banyak dipilih oleh penderita kanker di Indonesia. Akan tetapi, pengobatan kanker menggunakan agen kemoterapi cenderung menimbulkan kegagalan dikarenakan rendahnya selektifitas obat-obat antikanker⁴. Maka dari itu, usaha penemuan obat antikanker yang aman dan selektif terhadap pengobatan dan pencegahan kanker khususnya yang berasal dari tanaman obat perlu dilakukan.

Tanaman kelor (*Moringa oleifera* L.) merupakan tanaman dengan batang yang lembut yang memiliki buah, akar dan daun yang telah dilaporkan memiliki beberapa manfaat dalam industri pengobatan. Tanaman ini telah banyak dilaporkan memiliki aktivitas biologis seperti antiaterosklerosis⁵, penguat imun⁶, antikardiovaskular⁷, antivirus^{8,9,10,11}, antioksidan^{12,11,13,14}, antimikroba¹², antiinflamasi¹⁵ dan memiliki

aktivitas antitumor terhadap kanker hepato karsinoma, kanker kolon dan kanker myeloma^{16,17,18}. Namun, beberapa penelitian umumnya hanya melaporkan aktivitas antikanker daun *M. oleifera*, tetapi tidak pada dasar molekuler dari aktivitas antikanker tersebut. Penelitian ini dilakukan untuk mengamati mekanisme selular dan molekuler yang memperantarai aktivitas sitotoksik fraksi etil asetat daun *M. oleifera* terhadap sel kanker payudara T47D melalui pengamatan induksi apoptosis dan pengaruhnya terhadap ekspresi protein regulator apoptosis, yaitu Bcl-2.

Metode

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari alat-alat gelas, neraca analitik, mikropipet (Gilson), *yellow tips*, *blue tips*, tabung konikal (Iwaki), kultur *dish*, *haemocytometer* (Neubauer), *cell counter*, mikroskop *inverted* (Olympus), vortex, 96 *well plate* (Nunc), 24 *well plate* (Nunc), 6 *well plate* (Nunc), *cover slip* (Nunc), *shaker*, pinset, jarum, *object glass*, tabung *ependorf*, sentrifugator, inkubator CO₂ (Heraeus), *ELISA reader* (SLT 240 ATC), *laminar air flow cabinet* (Labconco), *flow cytometer* FACS-Calibur, *vacuum rotary evaporator* (Buchi).

Bahan

Bagian daun dari tanaman *M. oleifera* diperoleh dari Mangunreja, Tasikmalaya. Sel kanker payudara T47D diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada; pelarut DMSO (Merck); Medium Komplek sel T47D yang terdiri dari RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) 1640 (Gibco), Penisilin-Streptomisin 1% (v/v), FBS (Fetal Bovine Serum) 10% (v/v) (Gibco) dan fungizone 0,5% (Gibco); Tripsin-EDTA 0,25%, PBS (Phosphat Buffer Saline), Aqua Bidestilata, etanol 70%, reagen MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida] (Bio Basic Canada Inc); reagen stopper SDS (Sodium Deodesil Sulfat) 10%; Propidium Iodida (Roche); Annexin V (Roche); antibodi monoklonal primer Bcl-2 (Biocare), streptavidin berupa Horse Radish Peroxidase (HRP), 3,3'-diaminobenzidine (DAB), metanol, larutan hidrogen peroksidase (blocking solution), aquades, larutan Maye Haemotoxylin, alkohol, xylol, etanol 96%, etil asetat, *n*-heksana, metanol.

Prosedur Rinci

Pembuatan ekstrak

Daun *M. oleifera* dicuci dengan air mengalir, lalu dikeringkan dan dihaluskan. Serbuk kering kemudian dimaserasi dengan pelarut etanol 96% selama 3x24 jam. Ekstrak hasil maserasi kemudian dipisahkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga konsistensinya kental. Ekstrak etanol yang telah dipisahkan kemudian diekstraksi cair-cair (partisi) menggunakan pelarut air, *n*-heksana dan etil asetat. Fraksi etil asetat kemudian dievaporasi menggunakan *vacuum rotary evaporator* untuk menghasilkan residu fraksi etil asetat daun *M. oleifera*.

Uji sitotoksik

Uji sitotoksik dilakukan dengan metode MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide). Sejumlah 1x10⁴ sel didistribusikan ke dalam sumuran pada 96-*well plate* dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% bersuhu 37°C selama semalam. Fraksi etil asetat daun *M. oleifera* yang sudah dilarutkan dalam *co-solvent*

DMSO ditambahkan ke dalam sumuran dengan sepuluh seri kadar yaitu 500; 250; 125; 63,5; 31,25; 15,625; 7,8125; 3,90; 1,95 µg/mL selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media dan ekstrak dibuang kemudian sel dicuci dengan PBS. Pada masing-masing sumuran lalu ditambahkan 100 µl MTT konsentrasi 0,5 mg/mL. Sel diinkubasi kembali selama 4 – 6 jam dalam inkubator CO₂ 5% bersuhu 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Reaksi MTT dihentikan dengan reagen *stopper* yaitu SDS 10% dalam HCl 0,01N, lalu diinkubasi semalam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm.

Analisis data:

Regresi linear antara konsentrasi dan % sel hidup memberikan persamaan $y = Bx + A$ yang digunakan untuk menghitung nilai IC₅₀, yaitu konsentrasi yang menghambat 50% pertumbuhan sel.

Uji apoptosis:

Sel T47D ditanam ke dalam *6-well plate* dengan kepadatan sel sebesar 1×10^5 sel/sumuran. Setelah diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator CO₂ 5%, sel diberi perlakuan fraksi etil asetat daun *M. oleifera* dengan konsentrasi 300 µg/mL, 250 µg/mL, 200 µg/mL dan 150 µg/mL kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam. Setelah diinkubasi, sel dipanen menggunakan tripsin-EDTA 0,25% kemudian disentrifugasi pada 2000 rpm selama 3 menit, selanjutnya dicuci dengan PBS dingin. Sel diresuspensi dalam 500 mL buffer Annexin V dan kemudian diberi perlakuan dengan Annexin V dan Propidium Iodida (PI) selama 10 menit pada suhu ruang dan ditempat gelap.

Uji imunositokimia:

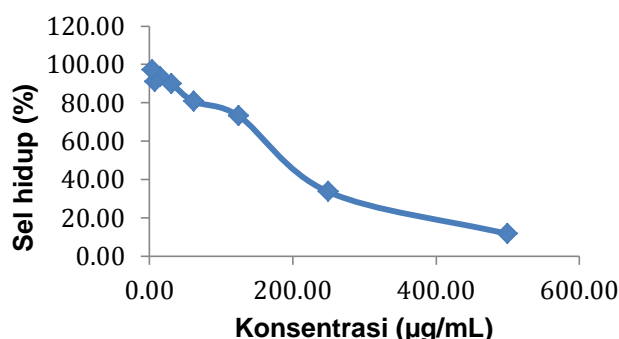
Sel T47D dengan kepadatan 5×10^4 sel/sumuran ditanam pada cover slips (Nunc) dalam 24-well plate (Nunc) sampai 80% konfluen. Setelah itu, plate tersebut diberi perlakuan senyawa uji dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya, medium diambil dan plate yang berisi sel dicuci dengan PBS. Selanjutnya, sel difikasasi dengan metanol dingin selama 10 menit pada suhu 4°C kemudian dicuci PBS. Selanjutnya sel diberi larutan hidrogen peroksida (blocking solution) pada suhu ruang. Sel kemudian dicuci kembali dengan PBS dan diinkubasi dengan *prediluted blocking serum* (Background Sniper). Selanjutnya, sel dicat dengan antibodi primer Bcl-2 dan Cyclin D1 selama 1 jam pada suhu ruang. Setelah dicuci kembali menggunakan PBS, antibodi sekunder ditambahkan ke dalam sel dan diinkubasi selama 10 menit lalu dicuci dengan PBS. Selanjutnya reagen yang berisi kompleks streptavidin-enzim peroksidase ditambahkan dan diinkubasi selama 20 menit lalu dibuang dan dicuci dengan PBS. Setelah itu, larutan substrat kromogen DAB ditambahkan dan diinkubasi selama sepuluh menit. Setelah diinkubasi, reagen DAB dibuang lalu dicuci dengan aquades. Selanjutnya larutan Haematoxylin ditambahkan ke dalam sumuran lalu diinkubasi selama sepuluh menit dan selanjutnya dibuang dan dicuci dengan aquades. *Cover slip* diangkat dengan pinset, kemudian dicelupkan dalam etanol dan dikeringkan. Setelah kering, *cover slip* dicelupkan lagi ke dalam xylol dan dikeringkan kembali. *Cover slip* diletakkan di atas *object glass*, kemudian ditetesi dengan lem (Mentellan), *cover slip* lalu ditutup dengan *cover slip* kotak. Ekspresi protein dapat diamati dengan mikroskop cahaya. Sel yang mengekspresikan protein Bcl-2 akan memberikan warna coklat/gelap, sedangkan yang tidak mengekspresikan protein Bcl-2 akan memberikan warna ungu/ biru.

Hasil

Aktivitas Sitotoksik Fraksi Etil Asetat daun *M. oleifera* terhadap Sel T47D

Uji sitotoksik dilakukan dengan menggunakan metode MTT. Absorbansi yang diukur linier dengan persentase sel hidup. Pengujian ini dilakukan dengan pemberian variasi konsentrasi fraksi etil asetat daun *M. oleifera* sebesar 1,95; 3,90; 7,8125; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 µg/mL. Nilai IC₅₀ fraksi etil asetat daun *M. oleifera* yang diperoleh dari pengujian terhadap sel T47D yaitu 243,58 µg/mL. Berdasarkan nilai IC₅₀-nya, fraksi etil asetat daun *M. oleifera* memiliki aktivitas kurang aktif sebagai antikanker karena menurut Kamuhabwa¹⁹, suatu ekstrak dianggap aktif jika memiliki nilai IC₅₀ ≤ 100 µg/mL, namun masih dapat dikembangkan sebagai antikanker karena suatu ekstrak dianggap tidak aktif jika nilai IC₅₀ > 500 µg/mL²⁰.

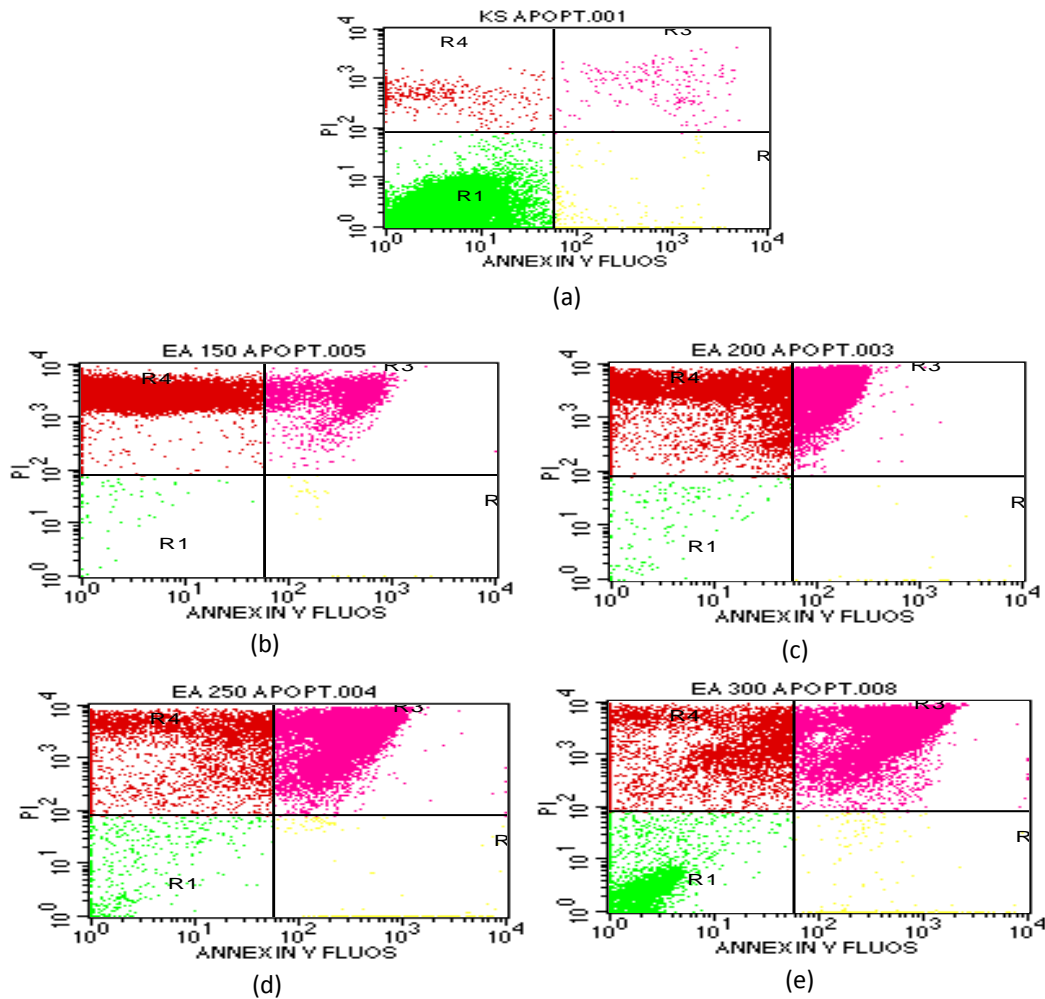
Berdasarkan pada pengamatan mikroskopis, pemberian fraksi etil asetat daun *M. oleifera* mengubah morfologi sel T47D dan menurunkan kerapatan sel. Meningkatnya konsentrasi fraksi etil asetat daun *M. oleifera* yang diberikan terhadap sel memberikan pengaruh terhadap perubahan morfologi sel, yaitu sel terlihat mengambang, pada bagian pinggir sel berwarna gelap, bagian tengah terlihat kosong, kepadatan sel berkurang dan tidak saling menempel (data tidak ditampilkan).



Gambar 2. Grafik persentase viabilitas sel T47D setelah diberi perlakuan dengan fraksi etil asetat daun *M. oleifera* pada berbagai konsentrasi (1,95 sampai 500 µg/mL) selama 24 jam. Fraksi etil asetat daun *M. oleifera* menghambat pertumbuhan sel bergantung pada konsentrasi, menghasilkan nilai IC₅₀ sebesar 243,58 µg/mL.

Pengaruh Fraksi Etil Asetat *M. oleifera* Terhadap Apoptosis Sel

Untuk mengetahui mekanisme kematian sel yang disebabkan oleh fraksi etil asetat daun *M. oleifera* dilakukan pengujian dengan analisis *flow cytometry*. Metode *flow cytometry* yang didahului dengan pewarnaan sel menggunakan Annexin V dan PI mampu membedakan sel hidup, apoptosis awal, apoptosis akhir dan nekrosis. Perlakuan fraksi etil asetat daun *M. oleifera* dengan konsentrasi 150, 200, 250 dan 300 µg/mL terhadap sel T47D menyebabkan terjadinya induksi apoptosis. Persentase total sel yang mengalami apoptosis meningkat dari 2,27% menjadi 14,17%; 56,81%; 75,92% setelah diberi fraksi etil asetat daun *M. oleifera* konsentrasi 150, 200, 250 µg/mL secara berturut-turut, namun mengalami penurunan yaitu menjadi 59,52% setelah diberi fraksi etil asetat daun *M. oleifera* konsentrasi 300 µg/mL. Di sisi lain, perlakuan fraksi etil asetat daun *M. oleifera* terhadap sel T47D juga menyebabkan tingginya persentase nekrosis yaitu 85,56%; 42,50%; 21,50% dan 23,33%.

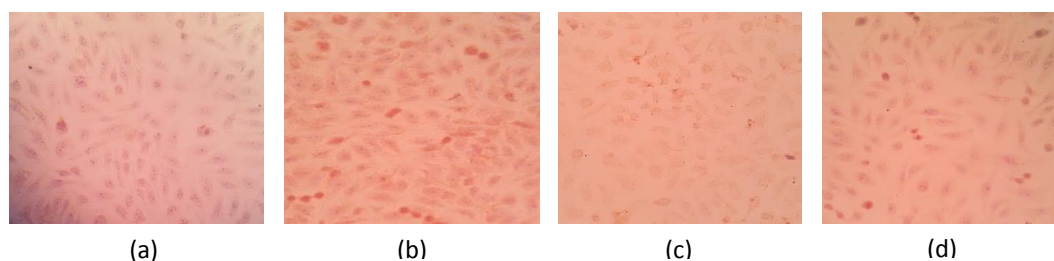


Gambar 2. Pengujian apoptosis menggunakan pewarnaan Annexin V-PI (a) kontrol sel, (b-e) sel T47D yang telah diberi perlakuan fraksi etil asetat daun *M. oleifera*. Sel dengan kepadatan 5×10^5 sel/sumuran didistribusikan ke dalam 6-well plate, kemudian diberi perlakuan dengan 150, 200, 250 dan 300 $\mu\text{g/mL}$ fraksi etil asetat daun *M. oleifera*. Hasil analisis dengan *flowcytometry* dari masing-masing sel: (a) kontrol sel, (b) 150 $\mu\text{g/mL}$ (c) 200 $\mu\text{g/mL}$ (d) 250 $\mu\text{g/mL}$ dan (e) 300 $\mu\text{g/mL}$. R1: sel hidup; R2: sel apoptosis awal; R3: sel apoptosis akhir; R4: sel nekrosis.

Pengaruh Fraksi Etil Asetat *M. oleifera* Terhadap Protein Bcl-2

Penelusuran jalur apoptosis pada penelitian ini dilakukan melalui pengamatan terhadap ekspresi protein Bcl-2 menggunakan metode imunositokimia dengan prinsip pengikatan antibodi spesifik. Gambar 3 secara visual menunjukkan bahwa

sitoplasma sel perlakuan uji mempunyai warna biru yang berbeda dengan dengan kontrol sel dengan antibodi spesifik Bcl-2 yang berwarna coklat. Warna biru tersebut terlihat lebih banyak diekspresikan seiring dengan meningkatnya konsentrasi fraksi etil asetat daun *M. oleifera* yang diberikan. Hal ini menunjukkan bahwa telah terjadi penurunan ekspresi Bcl-2 karena pemberian fraksi etil asetat daun *M. oleifera*. Penurunan ekspresi protein ini semakin meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi fraksi etil asetat yang diberikan.



Gambar 3. Penentuan ekspresi Bcl-2 pada sel T47D yang telah diberi perlakuan dengan fraksi etil asetat daun *M. oleifera* menggunakan metode imunositokimia. (a) kontrol sel, (b) fraksi etil asetat daun *M. oleifera* 150 µg/mL (c) 200 µg/mL dan (d) 250 µg/mL.

Pembahasan

Pemberian fraksi etil asetat daun *M. oleifera* terhadap sel kanker payudara T47D menginduksi kematian sel secara apoptosis. Persentase total sel apoptosis meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi fraksi etil asetat daun *M. oleifera* yang diberikan. Temuan ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Tiloke²¹ bahwa ekstrak daun *M. oleifera* memiliki aktivitas antiproliferatif terhadap sel kanker paru A549 dan dapat menginduksi apoptosis melalui peningkatan protein p53.

Sel T47D merupakan sel kanker payudara yang memiliki karakteristik caspase 2 *wildtype*, caspase 7 *wildtype*, ER/PR positif dan p53 *mutant*²². Pada sel T47D, induksi apoptosis yang terjadi dimungkinkan tidak melalui mekanisme p53. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme molekular yang memperantai terjadinya apoptosis. Pada penelitian ini dilakukan pengamatan pada salah satu protein antiapoptosis, yaitu Bcl-2.

Protein proapoptosis seperti Bax dan Bak dapat menginduksi pelepasan sitokrom c yang bersama dengan Apaf-1 menginduksi apoptosis melalui aktivasi caspase. Namun, keberadaan Bcl-2 sebagai protein antiapoptosis beraksi kebalikan^{23,24}. Dengan adanya efek penurunan terhadap ekspresi protein Bcl-2, semakin meyakinkan bahwa fraksi etil asetat daun *M. oleifera* berpotensi sebagai agen antikanker.

Protein Bcl-2 merupakan salah satu jenis protein anti apoptosis yang terlibat dalam proses apoptosis. NFkB dari downstream PI3K/Akt merupakan faktor transkripsi yang penting dalam transkripsi protein anti apoptosis seperti Bcl-2, IAP dan Bcl-xL²⁵. Terjadinya penurunan ekspresi Bcl-2 pada penelitian ini diduga karena adanya penghambatan jalur PI3K/Akt/NFkB. Hal ini berkorelasi dengan hasil penelitian dari Berkovich²⁶ yang menyatakan bahwa ekstrak daun *M. oleifera* telah dilaporkan mampu menghambat faktor transkripsi NF-kB pada sel Panc-1. Penekanan ekspresi protein Bcl-2 ini dapat menyebabkan terjadinya induksi

apoptosis karena pelepasan sitokrom c oleh mitokondria menjadi tidak terhambat yang kemudian dapat mengaktivasi jalur caspase.

Proses apoptosis tetap terjadi meskipun hasil visualisasi dari imunositokimia menunjukkan bahwa penurunan ekspresi protein Bcl-2 yang diinduksi oleh fraksi etil asetat daun *M. oleifera* tidak terlalu signifikan. Apoptosis yang terjadi kemungkinan melibatkan adanya peningkatan ekspresi protein proapoptosis seperti Bax dan Bak²⁷. Oleh karena itu, perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh pemberian fraksi etil asetat daun *M. oleifera* terhadap ekspresi protein proapoptosis.

Kesimpulan

Fraksi etil asetat daun *M. oleifera* memiliki aktivitas antikanker pada sel kanker payudara T47D dengan nilai IC₅₀ sebesar 243,58 µg/mL melalui induksi apoptosis. Perlakuan pada sel T47D dengan fraksi etil asetat daun *M. oleifera* juga dapat menurunkan ekspresi protein Bcl-2.

Daftar Pustaka

1. Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RL, Thun MJ. Global Cancer Facts & Figures. Atlanta. GA: American Cancer Society. 2007.
2. IARC. Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [Internet]. 2012 [cited 2017 Juli 12]. Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx.
3. Gibbs, JB. Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science*. 2000;287(5460);1969-73.
4. Da'i M, Melannisa R, Trisharyanti I. Mekanisme Molekuler Sitotoksitas Ekstrak Daun Jati Belanda Terhadap Sel Kanker. *Penelitian Fundamental*. Universitas Muhammadiyah Surakarta. 2013.p.8.
5. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Benzyl isothiocyanate inhibits excessive superoxide generation in inflammatory leukocytes: implication for prevention against inflammation-related carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2004;25;567–75.
6. Faizi, S., Siddiqui, B., Saleem, R., Saddiqui, S. & Aftab, K. Isolation and structure elucidation of new nitrile and mustard oil glycosides from *Moringa oleifera* and their effect on blood pressure. *J Nat Prod*. 1994;57;1256–61.
7. Khalafalla MM, Abdellatef E, Dafalla HM, Nassrallah AA, Aboul-Enein KM. Active principle from *Moringa oleifera* lam leaves effective against two leukemias and a hepatocarcinoma. *Afr J Biotech*. 2010;9;8467–71.
8. Waiyaput W, Payungporn S, Issara-Amphorn J, Panjaworayan N. Inhibitory effects of crude extracts from some edible Thai plants against replication of hepatitis B virus and human liver cancer cells. *BMC Com Alt Med*. 2012;12;246–52.
9. Lipipun V, Kurokawa M, Suttisri R, Taweechoatipatr P, Pramyothin P. Efficacy of Thai medicinal plant extracts against herpes simplex virus type 1 infection in vitro and in vivo. *Antivir Res*. 2003;60;175–80.

10. Murakami A, Kitazono Y, Jiwajinda S, Koshimizu K, Ohigashi H. Niaziminin, a thiocarbamate from the leaves of *Moringa oleifera*, holds a strict structural requirement for inhibition of tumor-promoter-induced Epstein-Barr virus activation. *Planta Med.* 1998;64;319–23.
11. Iqbal S, Bhanger MI. Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. *J Food Compos Anal.* 2006;19;544–55.
12. Sultana B, Anwar F, Ashraf M. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules.* 2009;14;2167–80.
13. Kumar V, Pandey N, Mohan V, Singh RP. Antibacterial and antioxidant activity of extract of *Moringa oleifera* leaves-An in vitro study. *Int J Pharm Scis.* 2012;12;89–94.
14. Kumar NA, Pari L. Antioxidant action of *Moringa oleifera* Lam. (drumstick) against antitubercular drugs induced lipid peroxidation in rats. *J Med Food.* 2003;6;255–9.
15. Kumar GS, Kumar B, Srinivasan BP, Nag TC, Srivastava S, Saxena R, Anggarwal A. Retinoprotective Effects of *Moringa oleifera* Via Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Anti-Angiogenic Mechanisms in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2013;29(4);419–26.
16. Budda S, Butryee C, Tuntipopipat S, Rungsipipat A, Wangnaithum S. Suppressive effects of *Moringa oleifera* Lam pod against mouse colon carcinogenesis induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Asian Pac J Cancer.* 2011;12;3221–8.
17. Bharali R, Tabassum J, Azad MR. Chemomodulatory effect of *Moringa oleifera* Lam on hepatic carcinogen metabolizing enzymes, antioxidant parameters and skin papillomagenesis in mice. *Asian Pac J Cancer Prev* 2003;4;131–9.
18. Brunelli D, Tavecchio M, Falcioni C. The isothiocyanate from glucomoringin inhibits NF- κ B and reduces myeloma growth in nude mice in vivo. *Biochem Pharmacol* 2010;79;1141–8.
19. Kamuhabwa A, Nshimo C, Witte P. Cytotoxicity of Some Medicinal Plant Extracts Used in Tanzanian Traditional Medicine. *J. Ethnopharmacol.* 2000;70(2);143–9.
20. Machana S, Weerapreeyakul N, Barusrux S, Nonpunya A, Sripanidkulchai B, Thitimetharoch T. Cytotoxic and Apoptotic Effects of Six Herbal Plants Against The Human Hepatocarcinoma (HepG2) Cell Line. *Chinese Medicine.* 2011;6(-);39.
21. Tiloke C, Phulukdaree A, Chuturgoon AA. The antiproliferative effect of *Moringa oleifera* crude aqueous leaf extract on cancerous human alveolar epithelial cells. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13;226.

22. Schafer JM, Lee ES, O'Regan RM, Yao K, Jordan VC. Rapid Development Of Tamoxifen-Stimulated Mutant p53 Breast Tumors (T47D) In Athymic Mice. *Clin Cancer Res.* 2000;6(11);4373-80.
23. Padanilam BJ. Cell Death Induced by Acute Renal Injury: A Perspective on the Contributions of Apoptosis and Necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;284;F608–F27.
24. Sekti DA, Mubarak MF, Armandani I, Junedy S, Meiyanto E. Ekstrak Etanolik Daun Awar–awar (*Ficus septica* Burm. f.) Memacu Apoptosis Sel Kanker Payudara MCF-7 Melalui Penekanan Ekspresi Bcl-2. *Majalah Obat Tradisional.* 2010;15;100–104.
25. Simstein R, Burow M, Parker A, Weldon C, Beckman B. Apoptosis, Chemoresistance and Breast Cancer: Insight from the MCF-7 Cell Model System. *Exp. Biol. Med.* 2003;228;995–1003.
26. Berkovich L, Earon G, Ron I, Rimmon A, Vexler A, Lev-Ari S. *Moringa oleifera* aqueous leaf extract down-regulates nuclear factor-kappa B and increases cytotoxic effect of chemotherapy in pancreatic cancer cells. *BMC Complement Altern Med* 2013;13;212.
27. Ricci MS, Zhong WX. Chemotherapeutic Approach for Targeting Cell Death Pathway. *The Oncologist.* 2006;11;342–57.