Jurnal Farmasi Higea, Vol. 16, No. 1 (2024)
Available online at www.jurnalfarmasihigea.org

e-ISSN : 2541-3554
p-ISSN : 2086-9827

UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK *n*-HEKSAN DAUN ALPUKAT (*Persea americana* Mill) TERHADAP SEL KANKER KULIT B16F0 DENGAN METODE *MICROCULTURE TETRAZOLIUM TEST*

Dwi Dinni Aulia Bakhtra[1*], Anzharni Fajrina[1], Putri Ameliona[2]

[1]Departemen Biologi Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Padang (STIFARM Padang)
[2]Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Padang (STIFARM Padang)
**E-mail: dwidinni89@gmail.com*

Abstrak

Tanaman alpukat (*Persea americana* Mill) merupakan salah satu jenis tanaman yang banyak digunakan secara empiris untuk terapi pengobatan oleh masyarakat. Kandungan metabolit sekunder dari daun alpukat memberikan bioaktivitas yang bervariasi. Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh pemberian ekstrak n-heksan daun alpukat *Persea americana* Mill terhadap pertumbuhan sel B16F0 dan menentukan aktivitas sitotoksik terhadap sel B16F0. Penentuan efek sitotoksik dan pengaruh terhadap sel B16F0 dilakukan metode *Microculture Tetrazolium Test* (MTT) dengan 3-(4,5-dimethylthiazol- 2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromida. Dari hasil penelitian yang didapatkan hasil bahwa ekstrak n-heksan *Persea americana* Mill mempengaruhi pertumbuhan sel B16F0, peningkatan konsentrasi uji mempengaruhi persentase jumlah sel yang hidup. Ekstrak n-heksan dari daun alpukat (*Persea americana* Mill) memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai IC_{50} 17,9 µg/mL, yang berada dalam kategori sangat toksik. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak n-heksan daun alpukat *Persea americana* Mill mempengaruhi pertumbuhan sel dalam kategori sangat toksik.
Kata kunci*:* *Persea americana* Mill; sel B16F0; aktivitas sitotoksik

Abstract

The avocado plant (*Persea americana* Mill) is a type of plant that is widely used empirically for treatment by the community. The content of secondary metabolites from avocado leaves provides a variety of bioactivity. This study aims to see the effect of n-hexane extract from *Persea americana* Mill avocado leaves on the growth of B16F0 cells and determine the cytotoxic activity of B16F0 cells. The determination of the cytotoxic effect and the effect on B16F0 cells was carried out using the Microculture Tetrazolium Test (MTT) method with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide. The research results found that the n-hexane *Persea americana* Mill extract affected the growth of B16F0 cells; an increase in the test concentration affected the percentage of the number of living cells. The n-hexane extract from avocado leaves (*Persea americana* Mill) has cytotoxic activity with an IC_{50} value of 17.9 µg/mL, which is in the very toxic category. From the study results, it can be concluded that *Persea americana* Mill extract affects cell growth in the very toxic category.
Kata kunci: Persea americana Mill; B16F0 cells; cytotoxic activity

PENDAHULUAN

Kanker kulit adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh berubahnya sifat-sifat penyusun sel kulit yang normal menjadi ganas, dimana sel terus membelah menjadi bentuk yang abnormal secara tidak terkontrol akibat kerusakan DNA. Kanker kulit merupakan tiga serangkai keganasan pada umumnya yang sering ditemukan di Indonesia selain kanker serviks dan kanker payudara (Hendaria *et al.*, 2013).

Terdapat beberapa pengobatan kanker di seperti pembedahan, kemoterapi, terapi hormonal dan terapi radiasi. Dari beberapa metode tersebut yang paling sering digunakan untuk pengobatan kanker yaitu kemoterapi, dimana pengobatan kemoterapi banyak menimbulkan efek seperti mual, muntah, anoreksia, anemia, rambut rontok dan penurunan imunitas, pengobatan dengan kemoterapi cenderung bersifat

e-ISSN : 2541-3554
p-ISSN : 2086-9827

toksik (Akmal *et al.*, 2017).

Dari hal tersebut diketahui bahwa banyak sekali kekurangan dari pengobatan menggunakan metode tersebut, maka semakin banyak peneliti yang ingin mencoba melakukan penelitian dalam mencari sumber alternatif pengobatan dari bahan alam. Salah satu tanaman obat tradisional yang telah digunakan secara empiris oleh masyarakat adalah daun alpukat (Awaludin & Gusri, 2018).

Daun alpukat telah digunakan secara empiris untuk beberapa terapi pengobatan (Dalimartha, 2008). Kandungan kimia daun alpukat yaitu saponin, alkaloid, flavonoid, polifenol,quersetin, dan gula alkohol (Yuliani *et al.*, 2019).

Pada penelitian terdahulu ekstrak etanol daun dan biji alpukat memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa, MCF-7 dan HepG2 (Mardiyaningsih & Ismiyati, 2014; Abubakar *et al.*, 2017). Ekstrak n-heksan daun alpukat dengan aktivitas sangat toksik dengan metode BLST (Riswan, 2018). Penelitian Widiyastuti *et al.*, (2018), fraksi metanol biji alpukat memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7. Penelitian Yuliani *et al.*, (2019), ekstrak etanol daun alpukat memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D dan tidak sitotoksik terhadap sel WiDr.

Berdasarkan dari uraian di atas, maka perlu dilakukan uji lanjutan dari aktivitas sitotoksik ekstrak n-heksan terhadap sel kultur kanker. Dalam penelitian ini digunakan sel kultur kanker kulit B16F0 dengan metode *metode microculture tetrazolium test* (MTT).

METODE

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah rotary evaporator (Ika®), inkubator CO_2 (NU-5100E, Nuaire, USA), timbangan analitik (Precisa), sentrifus (Universal 32 R, Hettich Zentrifugen, USA), Elisa reader (Dynatech MR5000 TECAN), Tecan Group Ltd., Switzerland), inverted microscope (TC 5400, Meiji Techno, Japan), haemacytometer (Hirschmann, EM Techcolor, Germany), laminar airflow (LAF) (Jouan MSC 12, Thermo Fisher Scientific, USA), flask culture 25 cm³, 96 well plate, filter 0,22 µm, syringe filter 5 ml, plat silika gel 60 F254 (Merck), Furnace carbolite (CWF 1200®).

Bahan yang digunakan adalah daun alpukat (*Persea Americana* Mill), asam sulfat (H_2SO_4), kloroform ($CHCI_3$), amoniak (NH_3), HCI pekat, $FeCI_3$, paraffin cair, $HgCI_2$, aquadest (H_2O) (PT. Bratachem), Etil asetat (PT. Bratachem), air suling (PT. Bratachem), kalium iodida, N-heksan (PT. Bratachem),dimetilsulfoksida (DMSO), RPMI, sel B16F0 (koleksi Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas), phosphate buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich Chemical Co., USA), 3-(4,5- dimethylthiazol-2- yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT).

Prosedur kerja

Pembuatan dan karakterisasi simplisia

Sampel yang digunakan adalah daun alpukat yang muda sebanyak 1 kg dan identifikasi tumbuhan dilakukan di Herbarium Universitas Andalas (ANDA). Proses pembuatan simplisia melalui tahapan sebagai berikut, pengumpulan sampel, sortasi basah, pencucian, perajangan (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1985). Karakterisasi simplisia yang dilakukan berupa pengukuran susut pengeringan, kadar abu total, dan kadar abu tidak larut asam (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008).

Proses ektraksi daun alpukat

Ekstraksi simplisia daun alpukat dilakukan dengan metode maserasi dengan dengan pelarut n-heksan. Maserat yang telah disaring kemudian diuapkan dengan

e-ISSN : 2541-3554
p-ISSN : 2086-9827

penguapan vakum (*rotary evaporator*) sehingga diperoleh ekstrak kental (Ismiati *et al.*, 2014). Ekstrak kental diidentifikasi profil KLT dan skrining metabolit sekundernya.

Uji aktivitas sitotoksik

Uji aktivittas sitotoksik dilakukan dengan menggunakan metode MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Sel B16F0 diberi ekstrak heksan daun alpukat dan diinkubasi pada suhu 37 ℃ selama 24 jam pada 96 well plate. Setelah diinkubasi 24 jam, ditambahkan reagen MTT 100 µl (50 mg serbuk MTT dalam 10 ml PBS) per well dan diinkubasi 2-4 jam. Setelah kristal formazan terbentuk, tambahkan stopper 100 µl SDS 10% dalam 0.01 N HCl. Dengan menggunakan ELISA reader, ukur nilai absorban masing-masing sel. Dengan persamaan regresi antara log konsentrasi dan viabilitas sel, tentukan nilai IC_{50}.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini diawali dengan pengambilan sampel daun alpukat dan diidentifikasi spesies tanamannya. Dari hasil identifikasi tanaman diketahui spesies daun alpukat yaitu *Persea americana* Mill dan family Lauraceae. Dari 1 kg daun alpukat didapatkan serbuk simplisia 200 g. Dari hasil karakterisasi serbuk simplisia, didapatkan nilai rata-rata susut pengeringan 8,8996 % ± 0,1158, menunjukkan bahwa susut pengeringan memenuhi standarisasi yang terdapat dalam Farmakope Herbal Indonesia (2017) tidak lebih dari 10%. Nilai rata-rata kadar abu total 4,1847 % ± 0,0117, menunjukan bahwa kadar abu memenuhi standarisasi yang terdapat dalam Farmakope Herbal Indonesia (2017) yaitu tidak lebih dari 4,2 %, dan kadar abu tidak larut asam adalah 0,0982 % ± 0,0152, menunjukan bahwa kadar abu memenuhi standarisasi yang terdapat dalam Farmakope Herbal Indonesia (2017) yaitu tidak lebih dari 4,2 % (tabel 1).

Tabel 1. Hasil karakterisasi simplisia daun alpukat

Parameter pengamatan	Rata-rata±SD
Susut pengeringan	8,8996 % ± 0,1158
Kadar abu total	4,1847 % ± 0,0117
Kadar abu tidak larut asam	0,0982 % ± 0,0152

Dari hasil ekstraksi menggunakan pelarut n-heksan terhadap 200 g simplisia didapatkan berat ekstrak 3,36 g dengan rendemen 1,68%. Dari hasil identifikasi profil KLT ekstrak n-heksan daun alpukat dengan eluen n-heksan dan etil asetat (3:2) diperoleh 6 bercak noda dengan nilai Rf: 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,7 0,8 (gambar 1). Semakin tinggi nilai Rf maka suatu senyawa bersifat non polar dan sebaliknya semakin rendah nilai Rf berarti senyawa tersebut bersifar polar (Balafif *et al.*, 2013).

Gambar 1. Profil KLT ekstran n-heksan daun alpukat (*Persea americana* Mill)

Kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak n-heksan daun alpukat (*Persea americana* Mill) adalah flavonoid, alkaloid, saponin, terpenoid, tanin. Menurut penelitian terdahulu, ekstrak n-heksan daun alpukat (*Persea americana* Mill) mengandung senyawa alkaloid, flavonoid dan tanin (Riswan, 2018).

Dari hasil pengujian diketahui bahwa ekstrak n-heksan daun alpukat

e-ISSN : 2541-3554
p-ISSN : 2086-9827

mempengaruhi pertumbuhan sel kultur kaker kulit B16F0. Pada konsentrasi tinggi nilai persentase sel hidup (viabilitas sel) semakin rendah (Tabel 2).

Tabel 2. Nilai viabilitas sel (%) setelah pemberian ekstrak n-heksan daun alpukat

Konsentrasi uji (µg/mL)	Viabilitas sel (%)
100	29,62
80	39.35
40	44,4
20	51,85
10	52,31

Dari hasil perhitungan antara konsentrasi uji dan nilai viabilitas sel (%) didapatkan nilai IC_{50} yaitu 17,9 µg/mL dengan kategori toksik. Menurut Prayong *et al.*, (2008) terdapat 3 kategori aktivitas sistotoksik berdasarkan nilai IC_{50}, suatu senyawa dikatakan sangat toksik atau mempunyai aktivitas sitotoksik apabila memiliki IC_{50}<100 mg/mL, memiliki aktivitas sitotoksik yang sifatnya toksik apabila IC_{50} berkisar 100-1000 mg/mL dan tidak toksik atau tidak memiliki efek sitotoksik apabila nilai IC_{50} >1000 mg/mL.

Efek sitotoksik yang ada pada ekstrak n-heksan daun alpukat (*Persea americana* Mill) dikarenakan adanya senyawa flavonoid dan alkoloid termasuk senyawa fenolik alam yang potensial sebagai antioksidan dan mempunyai bioaktifitas sebagai obat. Dalam Farmakope Herbal Indonesia (2017) daun alpukat mengandung flavonoid total sebagai kuersetin. Flavonoid dan alkaloid memiliki mekanisme sebagai antikanker karena sebagai antioksidan yang melalui mekanisme pengaktifan jalur apoptosis sel kanker.

Mekanisme apoptosis sel pada teori ini akibat fragmentasi DNA. Fragmentasi ini diawali dengan dilepasnya rantai proksimal DNA oleh senyawa oksigen reaktif seperti radikal hidroksil. Efek lainnya adalah flavonoid sebagai penghambat proliferasi tumor atau kanker yang salah satunya dengan menginhibisi aktivitas protein kinase sehingga menghambat jalur transduksi sinyal dari membrane ke sel inti. Flavonoid menghambat aktivitas reseptor tirosin kinase, karena aktivitas reseptor tirosin kinase yang meningkat berperan dalam pertumbuhann keganasan sel kanker. Flavonoid juga berfungsi untuk mengurangi resistensi tumor terhadap agen kemoterapi (Sangeetha *et al.*, 2016).

Penyebab lain flavonoid dapat membunuh sel kanker disebabkan karena adanya menyebabkan gugus OH^- pada flavonoid berikatan dengan protein integral membran sel. Hal ini menyebabkan terbendungnya transport aktif Na^+, K^+. Transport aktif yang berhenti menyebabkan pemasukan ion Na^+ yang tidak terkendali ke dalam sel, hal ini menyebabkan pecahnya membrane sel. Pecahnya membran sel inilah yang menyebabkan kematian sel. Alkaloid yang berasal dari tumbuhan memiliki mekanisme sitotoksik yaitu berperan sebagai tubulin inhibitor. Pada proses siklus sel alkaloid berikatan dengan tubulin yaitu suatu protein yang menyusun mikrotubulus. Terikatnya tubulin pada alkaloid mengakibatkan polimerisasi protein menjadi mikrotubulus akan terhambat sehingga pembentukan spindle mitotik akan terhambat pula dan siklus sel akan terhenti pada metaphase karena tidak dapat melakukan pembelahan sel. Sel tersebut kemudian akan mengalami apoptosis (Nurhayati *et al.*, 2006).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat diambil kesimpulan bahwa ekstrak n-heksan daun alpukat (*Persea americana* Mill) berpengaruh terhadap pertumbuhan aktivitas sitotoksik terhadap sel B16F0. Ekstrak n-heksan daun alpukat (*Persea americana* Mill) memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai IC_{50} = 17,9 µg/mL.

e-ISSN : 2541-3554
p-ISSN : 2086-9827

DAFTAR RUJUKAN

Abubakar, A.N.F., Achmadi, S.S., & Suparto, I. H. 2017. Triterpenoid Of Avocado (Persea americana) Seed and Its Cytotoxic Activity Toward Breast MCF-7 and Liver HepG2 Cancer Cells. *Tropical Biomedicine*, 7(5): 397-400.

Akmal, M., Indahaan, Z., Widhawati., & Sari, S. 2017. *Ensiklopedi Kesehatan Untuk Umum*. Yogyakarta: Ar-Ruzz Media.

Awaludin., & Gusri, A. 2018. Pemberian Persea americana Mill pada pasien Hipertensi. *Ilmiah Permas*, 8(2):99-106.

Balafif, R.A.R., & Gunawan, E.R. 2013. Analisis Senyawa Triterpenoid Dari Hasil Fraksinasi Ekstrak Air Buah Buncis (*Phaseolus vulgaris* Linn). *Chem. Prog*, 6, (2): 56-61.

Dalimartha, S. 2008. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 5. Pustaka Bunda:Jakarta.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1985. *Cara Pembuatan Simplisia*. Jakarta: Dapertemen Kesehatan Republik Indonesia

Dapartemen Kesehatan Republik Indonesia. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi I*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat Dan Makanan

Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2017. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi II*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Hendaria, M. P., Asmarajaya A.A.G.N., & Maliyawan, S. 2013. Skin Cancer. *E-Jurnal Medika Udayana*, 2(2): 273-289.

Ismiati, N., & Trilestari. 2014. Pengembangan Formulasi Masker Ekstrak Air Daun Alpukat (*Persea americana* Mill) Sebagai Antibakteri *Staphylococcus aureus* Untuk Pengobatan Jerawat. *Pharmaciana*, 4(1): 45-52.

Mardiyaningsih, A., & Ismiyati, N. 2014. Cytotoxic Activity Of Ethanolic Extract Of *Persea americana* Mill. Leaves On Hela Cervical Cancer Cell. *Medicine Journal*, 19(1): 1410-5918.

Nurhayati A.P.D., Nurlita A. & Rachmat, F. 2006. Uji Toksisitas Ekstrak *Eucheuma Alvarezii* terhadap Artemia Salina sebagai Studi Pendahuluan Potensi Antikanker. *Akta Kimindo*, 2(1): 41-46.

Prayong P., Barusrux S., Weerapreeyakul N. 2008. Cytotoxic Activity Screening of Some Indigenous Thai Plants. *Fitoterapia*, 79 (7): 598-601

Riswan, A.A.R. 2018. Identifikasi Metabolit Sekunder Ekstrak n-heksan dari Daun Alpukat (*Persea americana*) Dan Uji toksisitas Terhadap *Artemia salina* Leach. Makassar:Fakultas Sains dan Teknologi.

Sangeetha, K.S.S., Umamaheswari, S., Reddy, C.U.M., & Kalkura, S.N. 2016. Flavonoids: Therapeutic Potential Of Natural Pharmacological Agents. *JPSR*, 7(10): 3924-3930.

Widiyastuti, Y., Pratiwi, R., Riyanto S., & Wahyuono, S. 2018. Cytotoxic activity and apoptosis induction of avocado Persea americana Mill. Seed extract on MCF-7 cancer cell line. *Biotechnology*, 23(2): 61-67.

Yuliani, R., Santoso, B., & Sari, M. D. 2019. Cytotoxic Activity Screening of Ethanolic Extract of Longan Leaves (*Dimocarpus longan*), Jamaican Cherry Leaves (*Muntingia calabura*), and Avocado Leaves (*Persea american*) against T47D dan WiDr Cells. *Pharmacon*, 16(2): 2685-5062.