

UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN ALPUKAT (*Persea americana* Mill)

Dwi Dinni Aulia Bakhtra*, Anzharni Fajrina, Selvia Wiliantari, Meike Puspitasari

Departemen Biologi Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Padang (STIFARM Padang), Indonesia

*E-mail: dwidinni89@gmail.com

Abstrak

Tanaman alpukat (*Persea americana* Mill) merupakan salah satu jenis tanaman yang banyak digunakan sebagai obat tradisional. Daun alpukat menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker dan aktivitas antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etil asetat daun alpukat terhadap sel kultur HeLa dan menentukan aktivitas sitotoksiknya. Penelitian ini menggunakan pelarut etil asetat untuk mengekstraksi daun alpukat dan pengujian aktivitas sitotoksik menggunakan metode *Microculture tetrazolium test* dengan berbagai variasi konsentrasi uji. Dari hasil penelitian, ekstrak etil asetat daun alpukat mempengaruhi pertumbuhan sel HeLa, peningkatan konsentrasi menurunkan persentase viabilitas sel HeLa. Dari hasil pengujian, ekstrak etil asetat daun alpukat memiliki aktivitas sitotoksik yang berada dalam kategori toksik dengan nilai IC_{50} 139,2515 $\mu\text{g/mL}$. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak etil asetat daun alpukat dapat mempengaruhi pertumbuhan sel dan memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa.

Kata kunci: *Persea americana* Mill; HeLa; aktivitas sitotoksik

Abstract

The avocado plant (*Persea americana* Mill) is one plant widely used as a traditional medicine. Avocado leaves produce secondary metabolite compounds that have the potential to be developed as anticancer drugs and antioxidant activity. This study aims to determine the effect of avocado leaf ethyl acetate extract on HeLa culture cells and determine its cytotoxic activity. This study used ethyl acetate solvent to extract avocado leaves and cytotoxic activity testing using the *Microculture tetrazolium test* method with various test concentrations. From the study's results, avocado leaf ethyl acetate extract affected the growth of HeLa cells; increasing concentration decreased the percentage of HeLa cell viability. From the test results, avocado leaf ethyl acetate extract has cytotoxic activity in the toxic category with an IC_{50} value of 139.2515 $\mu\text{g/mL}$. From the study results, it can be concluded that avocado leaf ethyl acetate extract can affect cell growth and has cytotoxic activity against HeLa cells.

Keywords: *Persea americana* Mill; HeLa cells; cytotoxic activity

PENDAHULUAN

Kanker adalah penyakit yang di sebabkan oleh pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh tidak normal, tumbuh sangat cepat dan tidak terkendali (Akmal *et al.*, 2017). Menurut *International Agency for Research on Cancer* (IARC), tahun 2020 kanker payudara merupakan jenis kanker yang paling sering didiagnosis di dunia, dengan lebih dari 2,26 juta kasus baru kanker payudara di seluruh dunia. Kanker payudara menjadi jenis kanker yang paling sering didiagnosis di kalangan wanita dan penyebab kematian akibat kanker yang paling umum pada wanita.

Pengobatan kanker biasanya menimbulkan efek yang tidak diinginkan dan memberi rasa tidak nyaman setelah melakukan terapi. Hal ini dipicu karena agen antikanker tidak hanya membunuh sel kanker, tetapi juga membunuh sel normal yang berdiferensiasi cepat. Hal ini menyebabkan giatnya para peneliti mencari terapi alternatif yang berasal dari bahan alam.

Tumbuhan banyak dimanfaatkan manusia sebagai obat, salah satunya adalah daun alpukat (*Persea americana* Mill.). Daun alpukat (gambar 1) memiliki kandungan metabolit sekunder yang dapat dimanfaatkan sebagai antikanker.



Gambar 1. Daun alpukat

Berdasarkan penelitian terdahulu, ekstrak etanol daun alpukat memiliki aktivitas sitotoksik pada sel HeLa dan menginduksi apoptosis pada sel MCF-7 (Mardiyarningsih *et al.*, 2014; Widiyastuti *et al.*, 2018). Menurut Abubakar tahun 2017, ekstrak etanol biji alpukat memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7 dan HepG2. Ekstrak etanol daun alpukat menurunkan persentase sel T47D dan sel WiDr, dan menghambat pertumbuhan sel HeLa (Mardiyarningsih *et al.*, 2014; Yuliani *et al.*, 2019). Ekstrak n-heksan daun alpukat memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker kulit (Bakhtra *et al.*, 2023). Fraksi n-heksan biji alpukat memiliki aktivitas sitotoksik dan dapat menginduksi apoptosis terhadap sel T47D (Rahmawati & Maryati, 2021).

Aktivitas sitotoksik yang dihasilkan dari tanaman alpukat disebabkan kandungan metabolit sekundernya. Daun alpukat mengandung senyawa golongan flavonoid, alkaloid dan saponin, polifenol, quersetin, dan gula alkohol (Yuliani *et al.*, 2019; Bakhtra *et al.*, 2023).

Dari uraian di atas peneliti tertarik melakukan pengujian uji sitotoksik ekstrak etil asetat daun alpukat terhadap sel kanker HeLa dengan metode *Microculture Tetrazolium Test* (MTT) karena metabolit sekunder dari daun alpukat sangat berpotensi untuk dikembangkan untuk pengobatan alternatif.

METODE

Alat Dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *rotary evaporator* (Ika[®]), inkubator CO₂ (NU-5100E, Nuaire, USA), sentrifus (Universal 32 R, Hettich Zentrifugen, USA), *Elisa reader* (Dynatech MR5000 TECAN), *Tecan Group* (Ltd., Switzerland), *inverted microscope* (TC5400, Meiji Techno, Japan), *haemocytometer* (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 (H₂SO₄) (Merck), kloroform (CHCl₃) (Merck), amoniak (NH₃) (Merck), HCl pekat (Merck), FeCl₃ (Merck), HgCl₂ (Merck), aquadest (H₂O) (PT. Bratachem), Etil asetat (PT. Bratachem), air suling (PT. Bratachem), kalium iodida (PT. Bratachem), N-heksan (PT. Bratachem), dimetilsulfoksida (DMSO) (PT. Bratachem), RPMI, 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) dan sel HeLa (koleksi Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas), phosphate buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich Chemical Co., USA).

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 ekstraksi daun alpukat

Ekstraksi simplisia daun alpukat dilakukan dengan metode maserasi dengan dengan pelarut etil asetat. Maserasi yang telah disaring kemudian diuapkan dengan penguapan vakum (*rotary evaporator*) sehingga diperoleh ekstrak kental (Ismiati & Trilestari, 2014). Ekstrak kental diidentifikasi profil KLT dan skrining metabolit sekundernya.

Uji aktivitas sitotoksik

Uji aktivitas sitotoksik dilakukan dengan menggunakan metode MTT (3 - (4, 5 - dimethylthiazol- 2 - yl) - 2,5 diphenyltetrazolium bromide). Sel HeLa diberi ekstrak etil asetat daun alpukat dengan konsentrasi 100, 80, 40, 20 dan 10 $\mu\text{g/mL}$ dan diinkubasi pada suhu 37 °C 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 di dalam inkubator CO₂. Setelah kristal formazan terbentuk, tambahkan stopper 100 μl SDS 10% dalam 0,01 N HCl. Dengan menggunakan ELISA reader, ukur nilai absorban $\lambda=550-600$ nm. Dengan persamaan regresi antara log konsentrasi dan viabilitas sel, tentukan nilai IC₅₀ (CCRC, 2013).

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 100 g. Hasil karakterisasi simplisia daun alpukat (*Persea americana* Mill), nilai susut pengeringan 3,1308 % $\pm$ 1,3897, kadar abu total 4,2782 % $\pm$ 0,1088, kadar abu tidak larut asam 0,1317% $\pm$ 0,0125. 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 % $\pm$ 0,0152, menunjukkan bahwa kadar abu memenuhi standarisasi yang terdapat dalam Farmakope Herbal Indonesia (2017) yaitu tidak lebih dari 4,2 %. Berat ekstrak etil asetat yang diperoleh dari hasil ekstraksi 100 gram simplisia daun alpukat menggunakan pelarut etil asetat adalah 26,7306 gram dengan rendemen 26,7306 %

Tabel 1. Hasil karakterisasi simplisia daun alpukat

Parameter pengamatan	Rata-rata $\pm$ SD
Susut pengeringan	3,1308 % $\pm$ 1,3897
Kadar abu total	4,2782 % $\pm$ 0,1088
Kadar abu tidak larut asam	0,1317% $\pm$ 0,0125

Dari hasil identifikasi profil KLT ekstrak etil asetat daun alpukat dengan eluen n-heksan dan etil asetat (3:2) diperoleh 4 bercak noda dengan nilai Rf: 0,36; 0,64; 0,84; 0,88 (gambar 2). Semakin tinggi nilai Rf maka suatu senyawa bersifat non polar dan sebaliknya semakin rendah nilai Rf berarti senyawa tersebut bersifat polar (Balafif *et al.*, 2013).



Gambar 2. Profil KLT ekstrak etil asetat daun alpukat (*Persea americana* Mill)

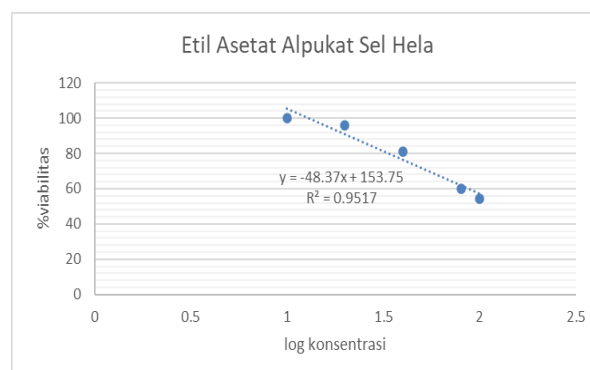
Kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada. Ekstrak etil asetat daun alpukat mengandung flavanoid, alkaloid, saponin, tannin dan terpenoid. Menurut penelitian terdahulu, ekstrak n-heksan daun alpukat (*Persea americana* Mill) mengandung senyawa alkaloid, flavonoid dan tanin (Riswan, 2018); (Bakhtra *et al.*, 2023).

Dari hasil pengujian diketahui bahwa ekstrak etil asetat daun alpukat mempengaruhi pertumbuhan sel kultur HeLa. Pada konsentrasi 100 µg/mL mempengaruhi persentase sel HeLa yang hidup lebih dari 50% (Tabel 2).

Tabel 2. Nilai viabilitas sel (%) setelah pemberian ekstrak etil asetat daun alpukat

Konsentrasi uji (µg/mL)	Viabilitas sel (%)
100	54,4179% ± 0,017
80	59,7475% ± 0,022
40	80,7854% ± 0,020
20	95,7924% ± 0,007
10	1402% ± 0,012

Dari hasil perhitungan persamaan regresi antara log konsentrasi uji dan nilai viabilitas sel (%) (gambar 3) didapatkan nilai IC₅₀ yaitu 139,2515 µg/mL dengan kategori toksik. Menurut Prayong *et al.*, (2008) terdapat 3 kategori aktivitas sistotoksik berdasarkan nilai IC₅₀, suatu senyawa dikatakan sangat toksik atau mempunyai aktivitas sitotoksik apabila memiliki IC₅₀ < 100 mg/mL, memiliki aktivitas sitotoksik yang sifatnya toksik apabila IC₅₀ berkisar 100-1000 mg/mL dan tidak toksik atau tidak memiliki efek sitotoksik apabila nilai IC₅₀ > 1000 mg/mL.



Gambar 3. Persamaan regresi aktivitas sitotoksik ekstrak etil asetat daun alpukat

Efek sitotoksik yang ada pada ekstrak etil asetat daun alpukat (*Persea americana* Mill) dikarenakan adanya senyawa flavonoid dan alkaloid termasuk senyawa alam yang potensial sebagai antioksidan dan mempunyai bioaktivitas 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 menghambat aktivitas protein kinase sehingga menghambat jalur transduksi sinyal dari membran ke sel inti. Flavonoid menghambat aktivitas reseptor tirosin kinase, karena aktivitas reseptor tirosin kinase yang meningkat berperan dalam pertumbuhannya keganasan sel kanker. Flavonoid juga berfungsi untuk mengurangi resistensi tumor terhadap agen kemoterapi (Sangeetha *et al.*, 2016).

Gugus OH- yang terdapat pada flavonoid dapat berikatan dengan protein integral yang ada pada membran sel, menyebabkan terganggunya transport aktif

dari Na^+ , K^+ . Transport aktif yang berhenti menyebabkan pemasukan ion Na^+ yang tidak terkendali ke dalam sel, hal ini menyebabkan pecahnya membran 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 berhenti 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 etil asetat daun alpukat (*Persea americana* Mill) berpengaruh terhadap pertumbuhan aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa. Ekstrak etil asetat daun alpukat (*Persea americana* Mill) memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai IC_{50} = 139,2515 $\mu\text{g/mL}$.

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. *Journal: Tropical Biomedicine*, 7(5): 397-400.
- Akmal, M., Indahaan, Z., Widhawati., & Sari, S. 2017. *Ensiklopedi Kesehatan Untuk Umum*. Yogyakarta: Ar-Ruzz Media.
- 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.
- Bakhtira, D. D. A., Fajrina, A., Ameliona, P. 2023. Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak n-Heksan Daun Alpukat (*Persea americana* Mill). *Jurnal Farmasi Higea*, 16(1):6-10.
- Cancer Chemoprevention Research Center. 2013. Uji Sitotoksik Metode MTT. Fakultas Farmasi UGM.
- 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.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 2020. Breast cancer, di akses 30 Juli 2024. <https://www.iarc.who.int/cancer-type/breast-cancer/>
- 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.
- Mardiyarningsih, 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
- Rahmawati, J., & Maryati, M. (2021). Aktivitas Sitotoksik dan Antiproliferasi Fraksi n-Heksan Biji Al-pukat (*Persea americana* Mill.) Terhadap sel T47D. *Pharmacon: Jurnal Farmasi Indonesia*, 18(1): 38-46.
- 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 americana*) against T47D dan WiDr Cells. *Pharmacon*, 16(2): 2685-5062.