

Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol dan Fraksi Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.) Terhadap Kanker Prostat Sel DU-145

Hesti Renggana, Asman Sadino, Salsabila Fathur Rahman, Andini Rosdiani
Program Studi Farmasi, Universitas Garut, Garut, Indonesia

*Corresponding author: hesti@uniga.ac.id

Abstract

Introduction: Cancer is one of the major health issues that contributes to high mortality rate globally, with prostate cancer being a notable example. Prostate cancer ranks second in terms of prevalence in both Indonesia and globally. One of the treatments for prostate cancer is chemotherapy, which can cause various side effects. There is a need for alternative anticancer agents derived from natural sources that are both effective and have minimal side effects. One such natural ingredient is avocado seeds (*Persea americana* Mill.). Avocado seeds contain ursolic acid, betulinic acid, and lupeol, which are part of the triterpenoid group. These three compounds have the ability to trigger apoptosis and inhibit the proliferation and metastasis of cancer cells. **Objective:** The aimed of this study was to evaluate the cytotoxic effects of avocado seed extracts and fractions (*Persea americana* Mill.) on DU-145 prostate cancer cells and to obtain the IC_{50} value. **Method:** The testing process involved extraction using maceration, fractionation with ECC, and cytotoxicity testing using the prestoblue assay method, with eight variations of concentrations: 7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, and 1000 ppm. The test results showed that the IC_{50} value for the ethanol extract was 599.9 $\mu\text{g/mL}$, indicating weak cytotoxic activity; for the water fraction, it was 428.2 $\mu\text{g/mL}$, also showing weak activity; the n-hexane fraction had an IC_{50} of 79.42 $\mu\text{g/mL}$, demonstrating strong cytotoxic activity; and the ethyl acetate fraction had an IC_{50} of 325.70 $\mu\text{g/mL}$, which also indicated weak activity against DU-145 prostate cancer cells. **Conclusion:** Compared to the ethanol extract, water fraction, and ethyl acetate fraction, the n-hexane fraction of avocado seeds has an IC_{50} value of <100 $\mu\text{g/mL}$, which is classified as having strong cytotoxic activity.

Keywords: Avocado Seed, DU-145 Cells, Prestoblue Assay,

Abstrak

Pendahuluan: Kanker merupakan salah satu isu kesehatan utama yang berkontribusi pada tingginya tingkat kematian secara global, salah satu penyebabnya ialah kanker prostat. Kanker prostat berada pada peringkat kedua kasus terbanyak di Indonesia maupun di dunia. Salah satu pengobatan kanker prostat adalah kemoterapi yang dapat menyebabkan berbagai efek samping. Dibutuhkan alternatif antikanker dari bahan alam yang memiliki efikasi yang baik dan efek samping yang minim. Salah satu bahan alam yang dapat digunakan adalah biji alpukat (*Persea americana* Mill.). Biji alpukat mengandung senyawa asam ursolat, asam betulinat, dan lupeol yang termasuk dalam kelompok triterpenoid. Ketiga senyawa ini memiliki kemampuan dapat memicu apoptosis serta menghambat proliferasi dan metastasis sel kanker. **Tujuan:** Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi efek sitotoksik ekstrak dan fraksi biji alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap sel kanker prostat DU-145 dan akan didapatkan nilai IC_{50} . **Metode:** Tahapan pengujian ini dilakukan ekstraksi dengan maserasi, fraksinasi dengan ECC, dan pengujian aktivitas sitotoksik dengan metode *prestoblue assay* dengan menggunakan 8 variasi konsentrasi 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 ppm. Hasil pengujian diperoleh nilai IC_{50} ekstrak etanol sebesar 599,9 $\mu\text{g/mL}$ yang memiliki aktivitas sitotoksik yang lemah, fraksi air sebesar 428,2 $\mu\text{g/mL}$ yang memiliki aktivitas sitotoksik yang lemah, fraksi n-heksan sebesar 79,42 $\mu\text{g/mL}$ yang memiliki aktivitas sitotoksik yang kuat, dan 325,70 $\mu\text{g/mL}$ pada fraksi etil asetat yang memiliki aktivitas sitotoksik yang lemah terhadap kanker prostat sel DU-145.

Kesimpulan: Dibandingkan dengan ekstrak etanol, fraksi air, dan etil asetat, fraksi n-Heksan biji alpukat memiliki nilai $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ yang dikategorikan memiliki aktivitas sitotoksik yang kuat.

Kata kunci: Biji Alpukat, Sel DU-145, *Prestoblue* assay,

PENDAHULUAN

Kanker merupakan suatu kondisi dengan ditandai adanya pertumbuhan sel abnormal serta berkembang dengan tidak terkontrol yang dapat menyebar ke sel dan jaringan lainnya (InfoDATIN 2019). Salah satu masalah kesehatan yang berkontribusi pada angka kematian tertinggi di seluruh dunia adalah kanker (Agustin 2020).

Berdasarkan data GLOBUCAN (*Global Burden of Cancer*) pada tahun 2022, di seluruh dunia tercatat sebanyak 20 juta kasus kanker, dengan 9,7 juta diantaranya adalah kanker prostat, yang mencakup 14,2% dari total kejadian. Di Indonesia angka kejadian kanker prostat sebanyak 13.130 (7,0%) kasus (Bray et al. 2024). Di negara berkembang angka kejadian kanker prostat lebih kecil jika dibandingkan dengan di negara maju (Christina et al. 2022).

Kanker Prostat merupakan pertumbuhan abnormal dan ganas pada prostat. Sebagian besar pertumbuhan berasal dari sel epitel dan diferensiasi, sehingga termasuk kedalam kategori karsinoma. Adenokarsinoma merupakan bentuk karsinoma prostat yang sangat umum, bersifat invasif dan terbentuk dari sel epitel neoplastik prostat dengan diferensiasi sekresi dalam berbagai pola histomorfologi (Rj Bott, Keng & Ng 2021).

Pengobatan kanker prostat di Indonesia banyak dijumpai pada stadium lanjut sebesar 59.3% dari keseluruhan kasus, terapi utama yang sering dipilih yaitu orkhiektomi sebesar 31.1%, penggunaan obat hormonal sebanyak 18%, prostatektomi radikal sebanyak 9%, radioterapi sebanyak 6%, sementara pilihan lain yang melibatkan pemantauan aktif, kemoterapi, dan kombinasi (Kemenkes 2019). Namun, berbagai efek samping yang tidak diinginkan, termasuk kerontokan rambut, penekanan pada sumsum tulang, resistensi terhadap obat, lesi pada saluran pencernaan, disfungsi neurologis, dan toksisitas jantung, sering muncul selama proses pengobatan.

Selain itu, sejumlah besar pasien mengalami prognosis yang buruk. Oleh karena itu, diperlukan pengobatan alternatif untuk antikanker yang dapat memberikan hasil lebih baik dan lebih sedikit efek samping. Bahan alam yang dapat digunakan sebagai pengobatan antikanker salah satunya ialah biji alpukat (*Persea americana* Mill.). (Rahmawati & Maryati 2021).

Pada biji alpukat terkandung beberapa macam senyawa metabolit sekunder, seperti tanin, alkaloid, saponin, flavonoid, terpenoid, steroid, serta senyawa fenolik, yang umumnya memiliki efek farmakologis (Kopon, Baunsele & Boelan 2020). Kebanyakan orang mengonsumsi alpukat hanya dagingnya saja, sedangkan bijinya dibuang begitu saja menjadi limbah. Ternyata biji alpukat memiliki banyak manfaat diantaranya sebagai antibakteri (Irna Wijaya 2020), antidepresan, antiinflamasi, antikolesterol (Muqowwiyah, Dewi & Artikel 2021), dan antikanker (Alkhalaf et al. 2019).

Senyawa utama metabolit sekunder pada biji alpukat (*P. americana* Mill.) yakni triterpenoid, yang telah dikenal memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker (Kamran et al. 2022).

Berdasarkan hasil pengujian yang telah dilakukan, aktivitas antioksidan dari biji alpukat memiliki nilai IC_{50} sebesar 37,75 mg/L saat diuji dengan menggunakan metode DPPH, yang mengindikasikan potensinya sebagai antioksidan (Alim, Hasan & Makassar 2022). Aktivitas antioksidan dapat diukur melalui nilai IC_{50} , untuk menunjukkan konsentrasi yang diperlukan dalam menghambat 50% pertumbuhan sel. Rendahnya nilai IC_{50} menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat (Agus Adrianta 2020). Oleh karena itu, biji alpukat memiliki kandungan antioksidan yang berpotensi sebagai agen antikanker.

Studi telah menunjukkan bahwa adanya aktivitas sitotoksik dari fraksi n-Heksan biji alpukat terhadap sel kanker payudara T47D dengan nilai IC_{50} sebesar 27,9 $\mu\text{g/mL}$ (Rahmawati & Maryati 2021). Kemudian, pada

ekstrak biji alpukat juga memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker kolon Caco-2 dengan nilai IC_{50} sebesar 28 $\mu\text{g/mL}$. (Lara-Márquez et al. 2020) serta pada sel kanker payudara MCF-7 dengan nilai IC_{50} sebesar 62 $\mu\text{g/mL}$ dan sel kanker hati HepG2 dengan nilai IC_{50} sebesar 12 $\mu\text{g/mL}$ (Abubakar, Achmadi & Suparto 2017).

Penelitian ini memiliki tujuan menentukan efek sitotoksik yang mungkin dimiliki ekstrak etanol dan fraksi biji alpukat (*P. americana* Mill.) terhadap sel kanker prostat DU-145 serta untuk memperoleh nilai IC_{50} .

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan diantaranya: simplisia biji alpukat (*P. americana* Mill.) yang diambil dari daerah Cimaung, Bandung, Provinsi Jawa Barat, sel DU-145, cisplastin, media RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute*), antibiotic, DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*), PBS (*Phosphate Buffered Saline*), tripsin-EDTA, trypan blue, *PrestoBlue™ Cell viability Reagent*. Pelarut dan pereaksi yang digunakan yaitu: etanol 96%, n-Heksan, aquabidest, kloroform, ammonia 25%, pereaksi *dragendroff*, HCl, FeCl_3 1%, pereaksi Mayer, amil alkohol, serbuk Mg, NaOH 1 N, Na_2SO_4 , eter, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat dan toluen.

Alat

Alat yang digunakan yaitu: *Microtiter plate* (*Thermo Scientific®*), *Biosafety Cabinet* (BSC), *hemocytometer*, microtube 1,5 ml, tube 15 ml, mikropipet (*Thermo Scientific®*), maserator, cawan penguap, CO_2 Inkubator, conical tube, mikroskop (*Thermo Scientific EVOS XL Core®*), neraca analitik, batang pengaduk, kertas perkamen, mortar stamper (ONEMED), labu alas bulat (*Pyrex®*), tabung reaksi (*Pyrex®*), gelas ukur (*Pyrex®*), gelas kimia (*Pyrex®*), Erlenmeyer (*Pyrex®*), penangas air (Memmert), corong pisah (*Pyrex®*), T-Flask (NEST®), sentrifugator (*Thermo Scientific®*), *rotary evaporator*, mikroplate 96 well plate, vortex (*freeze dry*) dan sanikator (*Thermo Scientific®*), Multimode reader (*Tecan Infinite M200 PRO®*).

Metode

Uji aktivitas sitotoksik ekstrak etanol dan fraksi biji alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap kanker prostat sel DU-145

Determinasi

Pengujian identifikasi sampel tumbuhan biji alpukat (*Persea americana* Mill.) dilakukan di Herbarium Bandungense, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung (ITB).

Preparasi Sampel

Setelah itu, sampel diproses melalui berbagai Langkah, seperti sortasi basah, pencucian, pengeringan, sortasi kering, uji karakteristik, dan penapisan fitokimia.

Metode Maserasi

Untuk proses maserasi, dimasukkan kedalam wadah sebanyak 500 gram serbuk simplisia biji alpukat (*P. americana* Mill.) kemudian direndam menggunakan etanol 96% pada waktu 3x24 jam dan disaring setiap 24 jam serta ditempatkan pada suhu kamar. Hasil maserasi selanjutnya disaring dengan menggunakan kain panel dan kertas saring. Setelah itu, filtrat dipadatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 70°C, lalu dilanjutkan pada *water bath* dengan suhu yang sama sampai ekstrak kental dihasilkan. (Rahmawati & Maryati 2021)

Metode Fraksinasi

Fraksinasi N-Heksan

Ekstrak kental kemudian dilarutkan dengan aquadest dalam perbandingan 1:5, lalu dimasukkan ke dalam corong pisah. Setelah itu, ditambahkan pelarut n-Heksan dalam perbandingan 1:1 dan campuran tersebut dikocok secara perlahan, kemudian gas dikeluarkan sesekali dengan membuka kran corong pisah agar udara yang ada di dalam dapat keluar dan tekanan udara menurun. Kemudian, dibiarkan sampai menjadi 2 fasa yang saling tidak tercampur. Kemudian, fraksi n-heksan yang diperoleh diambil dan ditampung, proses ini dilakukan sebanyak tiga kali pemisahan hingga diperoleh fraksi yang jernih. Fraksi n-heksan yang didapatkan

melalui ekstraksi cair-cair diuapkan dengan menggunakan metode rotary evaporator dan penangas air untuk memperoleh fraksi kental.

Fraksinasi Etil Asetat

Sejumlah ekstraksi cair-cair dari hasil fraksinasi n-heksan dan air ditambahkan kembali ke corong pisah, kemudian dimasukkan pelarut etil asetat pada corong pisah dengan menggunakan perbandingan 1:1. Campuran tersebut dikocok secara perlahan, sesekali gas dikeluarkan dengan membuka kran corong pisah agar udara yang ada di dalam dapat keluar sehingga tekanan udara menurun dan dibiarkan sampai terbentuk adanya 2 fasa yang saling tidak bercampur. Kemudian, fraksi etil asetat yang diperoleh diambil dan ditampung, proses ini dilakukan sebanyak tiga kali pemisahan hingga diperoleh fraksi yang jernih. Fraksi etil asetat yang didapatkan melalui ekstraksi cair-cair diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dan *water bath* untuk memperoleh fraksi kental.

Fraksinasi Air

Fase air yang sudah diperoleh melalui ekstraksi cair-cair kemudian dikentalkan dengan metode *freeze dry*.

Pengujian Sitotoksik Sel DU-145

Preparasi Media/ Kontrol Positif/ Reagent/ Sampel

Media yang digunakan adalah RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute*) komplet yang didalamnya terkandung 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*) dan antibiotik *Pencilin–Streptomycin* 50 µL/50 mL. Media dibuat didalam BSC dan ditempatkan pada lemari pendingin dengan suhu 4°C. Kontrol positif yang dipakai yaitu Cisplatin. Reagent yang akan digunakan yaitu *Resazurin Sodium Salt-Powder*, *Bioragent*. Sampel dengan 8 varian konsentrasi: 7,81; 15,62; 31,25; 62,50; 125; 250; 500; dan 1000 ppm masing-masing sebanyak 1 mL dilarutkan menggunakan pelarut DMSO 2%. (Harry Noviardi, Antonius Padua Ratu & Diah Ajeng Tri R 2019).

Preparasi Sel

Sel DU-145 sebelumnya diambil dalam suhu -80°C kemudian dimasukkan kedalam vial lalu dipindahkan kedalam 2 mikrotube berukuran

1,5 ml sejumlah 1 ml dan setiap mikrotube ditambahkan media sebanyak 1 ml yang selanjutnya akan di sentrifugasi selama 4 menit dengan kecepatan 2000 rpm. Setelah itu, pelet hasil sentrifugasi di *seeding* kedalam dish 10 cm dengan volume total 10 ml yang dilengkapi medium komplet. Sel harus *konfluen* minimal 70% supaya dapat digunakan, media dibuang lalu sel dibilas 2 kali menggunakan 1 mL PBS. Selanjutnya, ditambahkan 1 mL larutan *Trypsin-EDTA* dan inkubasi dengan waktu 5 menit untuk mendispersikan lapisan sel. Sel yang sudah diinkubasi dipindahkan ke dalam mikrotube berisi media. Sel disentrifugasi dengan waktu 5 menit serta kecepatan 3000 rpm. Terdapat 2 lapisan yaitu supernatan dan pelet dimana supernatan dibuang, lalu pelet kembali dilarutkan dengan media.

Seeding Cell ke dalam 96 Well plate

Untuk menentukan jumlah dan viabilitas sel dilakukan metode eksklusi trypan blue. Sel-sel di resuspend dengan memperhatikan kepadatan menggunakan mikroskop elektrik, dengan target jumlah sel 17.000 sel/mL dalam media. *Trypan blue* sebanyak 10 µL dimasukkan ke dalam *microtube* baru, kemudian 10 µL suspensi sel ditambahkan dan dihomogenkan. *Hemocytometer* dan tutup slip dibersihkan dengan etanol 70%. Selanjutnya, larutan sel *trypan blue* sebanyak 10 µL dimasukkan perlahan menggunakan pipet pada salah satu sisi bilik/*chamber*. Adanya sel sehat dihitung untuk menentukan jumlah sel (*viabel*) per mL. Sel-sel selanjutnya disuspensikan dalam media dan dipindahkan ke dalam *well plate*, dan inkubasi dengan suhu 37°C dan 5% gas CO₂ selama 24 jam.

Perlakuan Sel dengan Sampel/ Kontrol Positif/ Kontrol Negatif

Siapkan *microtube* 1,5 mL sebanyak 8 buah, kemudian setiap *microtube* diberi keterangan konsentrasi pengenceran yang sesuai (Berdasarkan protokol lab central UNPAD pengenceran dilakukan hingga 8 varian konsentrasi: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; dan 7,813 ppm), kedalam masing-masing *microtube* dimasukkan 500 µL media lalu dihomogenkan dengan cara *prewetting*. Disiapkan juga 3 buah *microtube* yang sudah

ditambah media untuk media dan sel, cisplastin, dan kontrol pelarut. Setelah proses inkubasi sel *seeding* selesai, *well plate* dikeluarkan dan diberi keterangan pada setiap *well* yang akan diberikan perlakuan oleh kontrol negatif, kontrol positif, blanko dan sampel. Media dari setiap *well* dibuang. Kemudian, masing-masing sebanyak 100 μL setiap sampel, kontrol negatif, kontrol positif, media pada *microtube* ke dalam setiap *well* 96 yang sudah berisikan sel dan diinkubasi dengan waktu 48 jam.

Pemberian Reagent PrestoBlue™ dan Pengukuran Absorbansi

Pada setiap *well plate* media dibuang, kemudian media sebanyak 9 mL disiapkan dalam *microtube* dan ditambahkan 1 mL "Resazurin Sodium Salt-Powder, BioReagent" (10 μL reagent untuk 90 μL media). Selanjutnya, 100 μL campuran larutan tersebut dimasukkan ke dalam setiap *well plate* selanjutnya diinkubasi dengan waktu 1-2 jam sampai terlihat adanya perubahan warna. Setelah itu, absorbansi diukur pada panjang gelombang 570 nm (dengan *reference* : 600 nm) menggunakan *multimode reader* (Bafadal et al. 2021).

Analisa Data

Analisa data ditentukan dari perhitungan nilai IC_{50} menggunakan analisis data melalui aplikasi *Graphad Prism* dengan memasukan data berupa log konsentrasi sampel pada sumbu x dan normalisasi % sel hidup pada sumbu y sehingga diperoleh grafik dan nilai IC_{50} secara langsung. Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi untuk mengetahui konsentrasi ekstrak dan fraksi air dari biji alpukat yang dapat menghambat pertumbuhan 50% sel kanker atau sel kontrol.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang digunakan adalah biji alpukat (*P. americana* Mill.) yang diambil dari Kec. Cimaung, Kab. Bandung, Provinsi Jawa Barat. Sebelum digunakan, dilakukan determinasi tanaman dengan tujuan memastikan identitas suatu tanaman yang akan digunakan pada penelitian sudah benar. Determinasi dilakukan

di Herbarium Bandungense, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institute Teknologi Bandung. Metode ekstraksi yang digunakan ialah metode maserasi dengan menggunakan 500 gram serbuk simplisia biji alpukat (*P. americana* Mill.) dan pelarut etanol 96% pada waktu 3x24 jam, lalu dilakukan pergantian pelarut setiap 24 jam. Penggunaan etanol dengan konsentrasi 96%, karena pada konsentrasi tersebut lebih mudah menembus dinding sel dibandingkan dengan etanol yang memiliki konsentrasi lebih rendah, hal ini akan menghasilkan ekstrak yang lebih pekat (Vita Wendersteyt, Wewengking & Sumantri Abdullah 2021). Lalu dilakukan penyaringan sehingga didapatkan ekstrak cair yang akan dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Hasil dari evaporator tersebut, kemudian dikentalkan di atas penangas air (*water bath*) hingga menghasilkan ekstrak kental dan kemudian dihitung % rendemennya. Hasil perhitungan dari % rendemen untuk mengetahui berapa banyak ekstrak yang dihasilkan selama proses ekstraksi, % rendemen ekstrak dikatakan baik jika % rendemen ekstrak yang diperoleh >10%. (Saerang, Jaya Edy & Siampa 2023) Hasil % rendemen ekstrak biji alpukat pada penelitian ini yaitu sebesar 17,81% dan memenuhi syarat, sehingga nilai % rendemen tersebut dapat dikatakan baik.

Ekstrak kental biji alpukat (*P. americana* Mill.) yang diperoleh, kemudian dilakukan fraksinasi untuk memisahkan suatu senyawa yang terkandung dari suatu ekstrak sesuai kepolarannya. Metode yang digunakan pada fraksinasi yaitu metode Ekstraksi Cair-Cair (ECC). Ekstraksi cair-cair adalah cara pemisahan fasa cair dengan menggunakan dua jenis pelarut dengan kepolaran berbeda. Jenis pelarut yang digunakan yaitu air memiliki sifat polar, n-Heksan memiliki sifat non polar, dan etil asetat memiliki semi polar (Herdiana & Aji 2020). Kemudian dilakukan pemeriksaan karakteristik simplisia biji alpukat yang dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil karakteristik simplisia biji alpukat

Karakteristik simplisia	Hasil	Standar MMI (%)
Susut pengeringan	0,32%	≤10%
Kadar air	4%	≤10%
Kadar sari larut etanol	19,19%	≥18,9%
Kadar sari larut air	20,15%	≥19%
Kadar abu total	4,87%	≤4,9%
Kadar abu tidak larut asam	1,51%	≤1,7%

Hasil pemeriksaan karakteristik simplisia biji alpukat (*P. americana* Mill.) berada pada rentang normal sesuai standar, sehingga biji alpukat (*P. americana* Mill.) memenuhi standar mutu yang tertera pada Materia Media Indonesia edisi III tahun 1979 sehingga simplisia biji alpukat memenuhi standar untuk dijadikan sebagai simplisia (Depkes RI 1979). Hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa banyak senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada ekstrak etanol biji alpukat seperti, alkaloid, saponin, flavonoid, tanin, kuinon, fenol, serta steroid/triterpenoid yang dibandingkan dengan literatur yang sudah ada (Depkes RI 1979).

Tabel 2. Hasil penapisan fitokimia ekstrak biji alpukat

Penapisan	Hasil	Literatur
Alkaloid	+	+
Flavonoid	+	+
Saponin	+	+
Tanin	+	+
Kuinon	+	+
Fenol	+	+
Steroid/triterpenoid	+	+

Pada pengujian sitotoksik yang dilakukan terhadap kanker prostat sel DU-145 dari ekstrak dan fraksi biji alpukat (*P. americana*

Mill.) dengan model penelitian secara *invitro* dan menggunakan metode *PrestoBlue*. Penggunaan metode *PrestoBlue* ini dikarenakan metode ini melengkapi kekurangan dari metode-metode sebelumnya, selain itu kelebihan dari metode ini, diantaranya merupakan metode terbaru, memiliki tingkat sensitivitas dan selektivitas yang tinggi, tidak bersifat toksik terhadap sel maupun pengguna dan mudah larut dalam air (Aslantürk 2018). Metode ini didasarkan pada perubahan warna *resazurin* (*7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide*) yang berasal dari warna biru dan direduksi menjadi *resorufin* (*7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one*) berwarna merah muda yang berflourescent. Hasil menunjukkan bahwa sel yang sudah mati dan sel yang masih hidup berbeda. Sel yang mati berwarna ungu kebiruan, sedangkan sel yang hidup berwarna merah muda.

Sebelum dilakukan pengujian, terlebih dahulu dilakukan preparasi media kultur cair yang akan digunakan yaitu RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute Medium*) komplet yang di dalamnya terkandung 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*) dan 50 µg/50 mL antibiotik *Penicillin-Streptomycin*. Penggunaan antibiotik *Penicillin-Streptomycin* pada pengujian ini untuk menghindari dan mencegah adanya kontaminasi dari bakteri. (Hassan & Ahmad 2020) Selain itu, dilakukan juga preparasi sel, kontrol positif, sampel dan reagen. Kontrol positif yang digunakan yaitu cisplatin, penggunaan cisplatin untuk kontrol positif dikarenakan cisplatin adalah salah satu obat sintetik yang telah menjalani uji klinis sebagai terapi adjuvant untuk pengobatan kanker dan menyebabkan kematian sel kanker. (Bafadal et al. 2021) yang memiliki mekanisme kerja dengan menginduksi apoptosis pada sel kanker melalui jalur intrinsik dan ekstrinsik, melibatkan regulasi proteolisis yang bergantung pada *capcase* dari beberapa protein seluler, blebbing membran, dan pembelahan endonukleolitik DNA kromosom. Dalam jalur ekstrinsik, *capcase* inisiator diaktifkan melalui kompleks sinyal pemicu kematian mengenai pengikatan ligan ekstraseluler seperti faktor nekrosis tumor.

Dalam jalur intrinsik apoptosis, permeabilisasi membran luar mitokondria menyebabkan aktivasi protein pro-apoptotik tertentu seperti sitokrom C dan aktivator *capcase* yang berasal dari mitokondria (Tchounwou et al. 2021). Sampel yang digunakan yaitu ekstrak etanol, fraksi n-Heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air biji alpukat (*P. americana* Mill.) yang masing-masing sampel telah dilakukan pengenceran dengan berbagai variasi konsentrasi yaitu 7,81; 15,62; 31,25; 62,50; 125; 250; 500; dan 1000 ppm. Sedangkan reagen yang akan digunakan yaitu *resazurin sodium salt-powder, bioreagent*. Dan pelarut yang digunakan dalam pembuatan sampel yaitu DMSO 2% (*Dimethyl Sulfoxide*) dikarenakan DMSO memiliki toksisitas yang rendah dan merupakan salah satu pelarut universal yang memiliki kemampuan dalam melarutkan hampir semua jenis senyawa, termasuk senyawa yang bersifat polar maupun non-polar. (Rahmi & Hilda Putri 2020; Hesti Renggana et al. 2022) Namun, penggunaan DMSO tidak boleh lebih dari 10% (Harry Noviardi et al. 2019).

Preparasi sel dilakukan saat sel sudah konfluen minimal 70% dan dapat digunakan untuk pengujian. Pada kondisi tersebut merupakan kondisi ideal untuk sel memberikan respon yang optimal ketika diberikan perlakuan. Kemudian dilakukan pembilasan sel dengan menggunakan PBS. Setelah itu, ditambahkan larutan *trypsin*-EDTA yang bertujuan untuk melepaskan sel karena akan dilakukan *seeding* sel dan diinkubasi dengan waktu 5 menit agar lapisan sel terdispersi. Kemudian, sel di sentrifugasi selama 5 menit serta pada kecepatan 3000 rpm.

Seeding sel dilakukan menggunakan *trypan blue exclusion* untuk mengukur viabilitas seldan jumlah sel. Metode *trypan blue* akan menunjukkan sel hidup atau mati, sel hidup tidak akan memberikan warna dikarenakan sel hidup memiliki membran sel utuh yang menghindari pewarnaan, sedangkan sel mati tidak (Aslantürk 2018). Selanjutnya, dilakukan *seeding* sel pada 96 *well plate* serta diinkubasi pada suhu 37°C dan 5% gas CO₂ dengan waktu 24 jam. Setelah sel dikultur, media dari setiap *well* dibuang, kemudian sampel dan kontrol ditambahkan pada setiap *well* yang berisi sel dengan variasi konsentrasi yang sesuai. Setelah itu, sel kembali diinkubasi selama 48 jam.

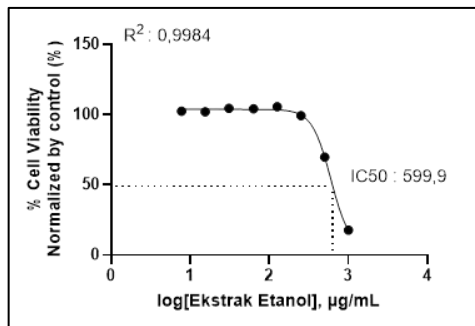
Kemudian setelah selesai diinkubasi, media dibuang dan sel diberikan 100 µL reagen *Resazurin Sodium Salt-Powder, Bioreagent* ke dalam setiap *well plate*, selanjutnya selama 1-2 jam sel diinkubasi sampai adanya perubahan warna.

Dalam pengujian ini, dilakukan perhitungan rata-rata % sel hidup dan dapat dilihat pada tabel 3. Kemudian dihitung IC₅₀ (*Inhibition Concentration 50*) sebagai parameter yang digunakan yaitu melihat aktivitas sitotoksik. Dengan menggunakan *software GraphPad Prism*, nilai IC₅₀ yang diperoleh dari hubungan grafik antara log konsentrasi terhadap rata-rata % sel hidup dan dapat dilihat pada tabel 4.

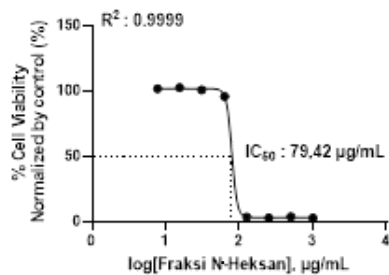
Tabel 3. Rata-rata % sel hidup ekstrak, Fraksi n-Heksan, Fraksi Etil asetat dan fraksi air biji alpukat terhadap sel DU-145

Konsentrasi (µg/mL)	Log Konsentrasi (µg/mL)	Rata-rata % Sel Hidup					
		Ekstrak	Fraksi n-Heksan	Fraksi Etil Asetat	Fraksi Air	Media + Sel	Cisplatin
7,81	0,89	102,29	101,91	100,85	100,03		
15,63	1,19	101,92	102,78	100,08	98,91		
31,25	1,49	104,43	101,01	100,67	99,33		

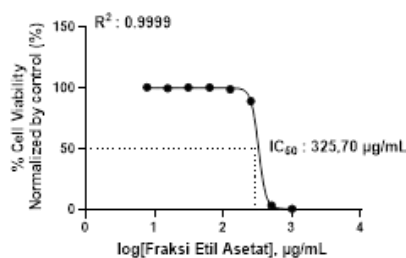
62,50	1,80	104,02	96,12	100,67	101,59	93,38	15,84
125	2,10	105,51	3,84	99,13	102,64		
250	2,40	99,23	3,24	89,41	98,85		
500	2,70	69,74	4,07	3,72	75,95		
1000	3,00	17,69	3,08	0,79	66,25		



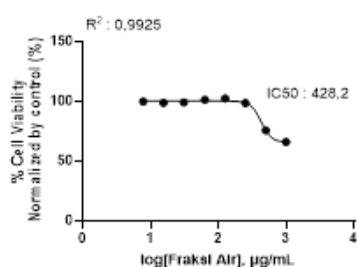
Gambar 1. Grafik hasil uji ekstrak etanol biji alpukat terhadap sel DU-145



Gambar 2. Grafik hasil uji fraksi n-Heksan biji alpukat terhadap sel DU-145



Gambar 3. Grafik hasil uji fraksi etil asetat biji alpukat terhadap sel DU-145



Gambar 4. Grafik hasil uji fraksi air biji alpukat terhadap sel DU-145

Tabel 4. Hasil nilai IC₅₀ ekstrak dan fraksi biji alpukat terhadap sel DU-145

Sampel	IC ₅₀ (µg/mL)	Standar	Aktivitas Sitotoksik
Ekstrak Etanol	599,9	>200	Lemah
Fraksi Air	428,2	>200	Lemah
Fraksi n-Heksan	79,42	<100	Kuat
Fraksi Etil Asetat	325,70	>200	Lemah

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas sitotoksik dengan memperoleh hasil akhir dengan menggunakan *software Graphad Prism* didapatkan nilai IC₅₀ pada fraksi n-Heksan sebesar 79,42 µg/mL yang menunjukkan aktivitas sitotoksik yang kuat terhadap sel kanker prostat DU-145, karena nilai IC₅₀ yang didapatkan <100 µg/mL. Sedangkan, pada ekstrak etanol sebesar 599,9 µg/mL; fraksi air sebesar 428,2 µg/mL; dan fraksi etil asetat sebesar 325,70 µg/mL yang menunjukkan aktivitas sitotoksik yang lemah terhadap sel kanker prostat DU-145, karena nilai IC₅₀ yang didapatkan >200 µg/mL. Hasil pengujian sitotoksik dinyatakan dengan nilai IC₅₀, yakni 50% konsentrasi senyawa yang dapat menghambat proliferasi sel kanker (Hesti Renggana et al. 2022). Semakin kecil nilai IC₅₀, semakin kuat sifat toksik dari sampel tersebut dibandingkan dengan sampel yang memiliki nilai IC₅₀ lebih besar.

Hasil dari aktivitas sitotoksik berkaitan dengan adanya metabolit sekunder yang

terdapat dalam sampel tanaman yaitu biji alpukat (*P. americana* Mill.). Dari hasil penapisan fitokimia dinyatakan bahwa biji alpukat mempunyai beberapa kandungan senyawa yang dapat digunakan sebagai agen antikanker, salah satu kandungannya yakni triterpenoid. Triterpenoid merupakan turunan dari terpenoid yang juga memiliki aktivitas antikanker. Selain itu, triterpenoid merupakan senyawa non polar, dimana senyawa tersebut hanya dapat ditarik oleh senyawa non polar seperti n-Heksan. Adapun senyawa yang terdapat didalam triterpenoid ialah asam ursolat, asam betulinat, dan lupeol (Iqbal et al. 2018; Kamran et al. 2022).

KESIMPULAN

Dari hasil pengujian dapat disimpulkan bahwa aktivitas sitotoksik ekstrak etanol dan berbagai fraksi biji alpukat (*P. americana* Mill.) pada kanker prostat sel DU-145 dengan menggunakan metode *PrestoBlue* assay didapatkan nilai IC₅₀ sebesar 79,42 µg/mL pada fraksi n-Heksan yang memiliki aktivitas sitotoksik kuat. Sedangkan, pada ekstrak etanol sebesar 599,9 µg/mL; fraksi air sebesar 428,2 µg/mL, dan fraksi etil asetat sebesar 325,70 µg/mL yang memiliki aktivitas sitotoksik yang lemah. Sehingga, fraksi n-Heksan biji alpukat (*P. americana* Mill.) menunjukkan aktivitas sitotoksik jauh lebih baik dibandingkan dengan ekstrak etanol, fraksi air, dan fraksi etil asetat. Diharapkan pada penelitian selanjutnya dapat melakukan pencarian senyawa aktif (isolat) dari fraksi n-Heksan pada biji alpukat (*P. americana* Mill.) serta melakukan pengujian sitotoksik terhadap sel kanker lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada semua pihak yang sudah membantu sehingga penelitian ini terselesaikan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

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', *Asian*

Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 7(5), 397–400.

Agus Adrianta, K., 2020, 'Aktivitas Antioksidan Daun Magenta (*Peristrophe bivalvis* (L.) Merr) Sebagai Salah Satu Kandidat Pengobatan Bahan Berbasis Herbal Serta Bioaktivitasnya Sebagai Analgetik', *Jurnal Ilmiah Medicamento*, 6(1), 2356–4818.

Agustin, T., 2020, 'Potensi Metabolit Aktif Dalam Sayuran Cruciferous untuk Menghambat Pertumbuhan Sel Kanker', *Jurnal Penelitian Perawat Profesional*, 2(4), 459–472.

Alim, N., Hasan, T. & Makassar, I., 2022, 'Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.) Asal Enrekang Sulawesi Selatan Dengan Metode DPPH', *Seminar Nasional Saind & Terapan VI*, 6, 166–175.

Alkhalaf, M.I., Alansari, W.S., Ibrahim, E.A. & ELhalwagy, M.E.A., 2019, 'Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activities of avocado (*Persea americana*) fruit and seed extract', *Journal of King Saud University - Science*, 31(4), 1358–1362.

Bafadal, M., Ode Mutiara, W., Hajrul Malaka, M., Fristiohady, A., M Yodha, A.W., Sadarun, B., Sahidin, I. & Hijau Bumi Tridharma Anduonohu, K., 2021, 'Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol *Petrosia* sp. Secara In Vitro Terhadap Sel Kanker Serviks HeLa', *JFSP*, 7(3), 2579–4558.

Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Soerjomataram, I. & Jemal, A., 2024, 'Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263.

Christina, S., Sanchia, H., Noerjani, R. & Angka, 2022, 'Kanker Prostat : Risiko dan Pencegahannya Prostat Cancer: Risk and Prevention', 1(2), 73–81.

Depkes RI, 1979, *Materi Medika Indonesia Jilid III*, 3rd edn., Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

- Harry Noviardi, Antonius Padua Ratu & Diah Ajeng Tri R, 2019, 'Sitotoksitas Ekstrak Etanol 70% Kulit Jengkol (*Archidendron jiringa* (Jack).I.C.Nielsen) Terhadap Penghambatan Sel Kanker Payudara MCF-7 dan Kanker Serviks HeLa', *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 5(1), 18–25.
- Hassan, S.N. & Ahmad, F., 2020, 'The relevance of Antibiotic Supplements in Mammalian Cell Cultures: Towards a Paradigm Shift', *Gulhane Medical Journal*, 62(4), 224–230.
- Herdiana, I. & Aji, N., 2020, 'Fraksinasi Ekstrak Daun Sirih dan Ekstrak Gambir serta Uji Antibakteri *Streptococcus mutans*', *Jurnal Ilmiah Kesehatan*, 19(3), 100–106.
- Hesti Renggana, Asman Sadino, Risa Susanti, Rahmi & Sujana, D., 2022, 'Sitotoksitas Ekstrak Etanol dan Fraksi-Fraksi Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) Terhadap Sel Kanker Prostat DU-145 dengan Metode MTT Assay', *Medical Sains: Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 7(2), 119–128.
- InfoDATIN, 2019, BEBAN KANKER.
- Irna Wijaya, 2020, 'Potensi Daun Alpukat (*Persea Americana* Mill.) Sebagai Antibakteri', *Jurnal Ilmiah Kesehatan Sandi Husada*, 9(2), 695–701.
- Kamran, S., Sinniah, A., Abdulghani, M.A.M. & Alshawsh, M.A., 2022, 'Therapeutic Potential of Certain Terpenoids as Anticancer Agents: A Scoping Review', *Cancers*, 14(5).
- Kemendes, 2019, Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Tata Laksana Kanker Prostat.
- Kopon, A.M., Baunsele, A.B. & Boelan, E.G., 2020, 'Skrining Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Metanol Biji Alpukat (*Persea Americana* Mill.) Asal Pulau Timor', *Akta Kimia Indonesia*, 5(1), 43.
- Lara-Márquez, M., Báez-Magaña, M., Raymundo-Ramos, C., Spagnuolo, P.A., Macías-Rodríguez, L., Salgado-Garciglia, R., Ochoa-Zarzosa, A. & López-Meza, J.E., 2020, 'Lipid-rich Extract from Mexican Avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) Induces Apoptosis and Modulates The Inflammatory Response in Caco-2 Human Colon Cancer Cells', *Journal of Functional Foods*, 64.
- Muqowwiyah, L.Z., Dewi, R.K. & Artikel, I., 2021, 'Potensi Ekstrak Daun Alpukat sebagai Anti Kolesterol', *Jurnal Tadris IPA Indonesia*, 1(3), 403–412.
- Rahmawati, J. & Maryati, M., 2021, 'Aktivitas Sitotoksik dan Antiproliferasi Fraksi n-Heksan Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.) Terhadap sel T47D', *Jurnal Farmasi Indonesia*, 18(1).
- Rahmi, M. & Hilda Putri, D., 2020, 'The Antimicrobial Activity of DMSO As a Natural Extract Solvent', *Serambi Biologi*, 5(2), 56–58.
- Rj Bott, S., Keng, F. & Ng, L., 2021, Prostate Cancer, Brisbane, Australia.
- Saerang, M.F., Jaya Edy, H. & Siampa, P., 2023, 'Formulasi Sediaan Krim dengan Ekstrak Etanol Daun Gedi Hijau (*Abelmoschus manihot* L.) Terhadap *Propionibacterium Acnes*', *PHARMACON*, 12(3), 350–357.
- Sulfahri, Iskandar, I.W., Novriyani, I., Damayanti, P., Arif Afriani, N., Sukmawaty, S., Iqraini, N., Nurhikmah, Fidhatami, I.I. & Razak, R., 2019, 'Potential analysis *Persea americana*, *Allium sativum* and *Ficus sepatica* as Anti-cancer Uses In Silico Docking and ADMET prediction', *Journal of Physics: Conference Series*, 1341(2).
- Tchounwou, P.B., Dasari, S., Noubissi, F.K., Ray, P. & Kumar, S., 2021, Advances in our understanding of the molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer therapy, *Journal of Experimental Pharmacology*, 13, 303–328.
- Vita Wendersteyt, N., Wewengkang, D.S. & Sumantri Abdullah, S., 2021, 'Uji Aktivitas Antimikroba dari Ekstrak dan Fraksi Ascidian *Herdmania momus* dari Perairan Pulau Bangka Likupang Terhadap Pertumbuhan Mikroba *Staphylococcus Aureus*, *Salmonella Typhimurium* dan *Candida Albicans*', *PHARMACON*, 10(1), 706–712.