

CYTOTOXIC ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACT OF *Persea americana* Mill. LEAVES ON HeLa CERVICAL CANCER CELL

AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOLIK DAUN ALPUKAT (*Persea americana* Mill.) PADA SEL KANKER LEHER RAHIM HeLa

Ana Mardiyarningsih* and Nur Ismiyati

D3 Diploma of Pharmacy, Poltekkes Bhakti Setya, Yogyakarta, Indonesia

ABSTRACT

*Cervical cancer is one of the most common cancer in women. The high mortality rate indicates that chemotherapy has not overcome cancer disease. Strategies and development of cervical cancer treatment should be pursued. Avocado leaf (*Persea americana* Mill) is one of natural product that had antioxidant activity by scavenging radicals and cytotoxic activity. The aim of the study was to identify the cytotoxic activity on HeLa cervix cancer cells and to identify the chemical substance groups of avocado leaves ethanol extract as chemopreventive agent. Active contents of avocado leaves was extracted by maceration with 96% ethanol. Chromatographic test were done to identify the chemical substances of avocado extract. Cytotoxic activity of avocado leaves ethanol extract was measured using MTT assay. The result of the phytochemical screening with thin layer chromatography test showed that the extract of avocado leaf contained flavonoids, alkaloids, and saponin. Avocado leaves ethanol extract inhibited HeLa cell growth with the IC_{50} of 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Morphology of Hela cell showed that extract inhibited cell growth in dose dependent. Keywords: *Persea americana* Mill., Cervical cancer, HeLa cell line, cytotoxic activity, thin layer chromatography*

ABSTRAK

*Kanker leher Rahim merupakan salah satu kanker yang paling terjadi pada wanita. Angka kematian yang tinggi menunjukkan bahwa kemoterapi tidak memberikan hasil yang baik sehingga perlu dikembangkan strategi untuk mengatasinya. Daun alpukat (*Persea americana* Mill) adalah salah satu produk alami yang memiliki aktivitas antioksidan dengan menangkap radikal bebas dan memiliki aktivitas sitotoksik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi aktivitas sitotoksik dari ekstrak etanolik daun alpukat pada sel kanker leher Rahim HeLa dan mengidentifikasi senyawa aktif yang ada pada daun alpukat. Senyawa aktif dari daun alpukat diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 96%. Uji kromatografi dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa aktif. Aktivitas sitotoksik ekstrak etanolik daun alpukat dilakukan dengan uji MTT. Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa daun alpukat mengandung senyawa golongan flavonoid, alkaloid dan saponin. Ekstrak etanol daun alpukat menghambat pertumbuhan sel HeLa dengan nilai IC_{50} sebesar 360 $\mu\text{g}/\text{ml}$.*

*Kata kunci: *Persea americana* Mill., kanker leher Rahim, sel HeLa, sitotoksik, kromatografi lapis tipis.*

PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyebab kematian utama kedua yang memberikan kontribusi 13 % kematian dari 22 % kematian akibat penyakit tidak menular utama di dunia (Oemiati dkk.,2011). Kanker serviks merupakan jenis kanker dengan insidensi yang tinggi. Penelitian menunjukkan bahwa terdapat 11.070 kasus kanker serviks di

Amerika pada tahun 2008. Terdapat 3.870 kematian yang disebabkan kanker serviks (Jemal *et al.*, 2008).

Pengobatan kanker dapat dilakukan dengan pembedahan, kemoterapi, maupun dengan radiasi. Namun pembedahan tidak efektif untuk kanker yang telah metastasis. Pengobatan dengan metode kemoterapi dan radiasi seringkali kurang selektif. Penggunaan kemoterapi juga memiliki efek samping toksik pada jaringan normal dan menyebabkan resistensi pada sel kanker (Davis *et al.*, 2003). Berdasarkan alasan tersebut, maka

*Corresponding author: Ana Mardiyarningsih
Email: mardiyarningsihana@yahoo.com

perlu dilakukan penelitian tentang pengobatan kanker yang selektif dan aman. Salah satunya dengan pengembangan agen kemopreventif dari bahan alam yang dapat memperlambat atau mencegah perkembangan sel kanker. Sebagian besar bahan alam khususnya tanaman mengandung zat aktif alamiah dengan berbagai aktivitas biologis antara lain sebagai antikanker.

Salah satu tumbuhan yang dapat dikembangkan sebagai agen kemopreventif pada sel kanker adalah daun alpukat (*Persea americana* Mill). Beberapa penelitian menunjukkan daun alpukat memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Ekstrak metanol daun alpukat memiliki aktivitas penangkap radikal bebas seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak (Asolu *et al.*, 2010). Penelitian Katja *et al.* (2009) menunjukkan ekstrak etanolik daun alpukat memiliki kemampuan kuat sebagai donor elektron dan dapat bereaksi dengan radikal bebas untuk diubah menjadi produk yang sangat stabil serta mengakhiri reaksi rantai radikal. Kemampuan tersebut menjadikan daun alpukat mampu bertindak sebagai *radical scavenger* terhadap metabolit antara reaktif senyawa karsinogen, sehingga mengurangi insiden terjadinya kanker.

Melalui penelitian ini akan diketahui aktivitas sitotoksik ekstrak etanolik daun alpukat pada sel kanker leher rahim HeLa. Selain itu juga dilakukan identifikasi kandungan kimia ekstrak etanolik daun alpukat, sehingga diketahui kemungkinan senyawa aktif yang berperan dalam aktivitas sitotoksik. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar pengembangan daun alpukat sebagai agen kemopreventif terhadap sel kanker leher rahim.

METODOLOGI

Ekstraksi daun alpukat

Bahan basah daun alpukat dilakukan sortasi, bagian daun dipetik dan dipisahkan dari bagian lain. Bahan dicuci dengan air bersih lalu dikeringkan di bawah sinar matahari hingga diperoleh simplisia kering. Simplisia dihaluskan dengan menggunakan blender dan diayak hingga diperoleh serbuk dengan ukuran 10/40. Serbuk selanjutnya ditambah dengan etanol 96 %, digojog selama kurang lebih 30 menit dan didiamkan selama 5 hari. Filtrat diuapkan etanolnya menggunakan penangas air hingga diperoleh sari kental ekstrak etanolik.

Analisis kandungan kimia

Analisis dengan KLT, dilakukan dengan menotolkan sampel pada fase diam (silika gel F₂₅₄) yang telah dipreparasi. Penotolan dilakukan sedikit demi sedikit hingga totalan cukup tebal

dan terlihat spotnya di bawah lampu UV₂₅₄. Lempeng KLT kemudian dielus dengan memasukkannya pada bejana KLT berisi fase gerak toluene-etil asetat-trimetilamin (70:20:10). Proses elusi dihentikan apabila fase gerak telah mencapai batas atas. Lempeng KLT diangin anginkan sebentar, kemudian diamati spot yang terpisah dengan sinar tampak, UV₂₅₄, UV₃₆₆, dan pereaksi semprot (Dragendorf untuk alkaloid, Uap amoniak 25% untuk flavonoid, dan vanillin-asam sulfat untuk saponin).

Kultur sel

Sel kanker serviks HeLa merupakan koleksi CCRC Fakultas Farmasi UGM. sel HeLa ditumbuhkan dalam DMEM (Gibco). Media kultur mengandung 10 % FBS (Gibco) dan 1 % penisilin4streptomisin (Gibco). Sel ditumbuhkan pada suhu 37°C dan 5 % CO₂. Sel dipanen dengan bantuan tripsin 0,25 % (Gibco).

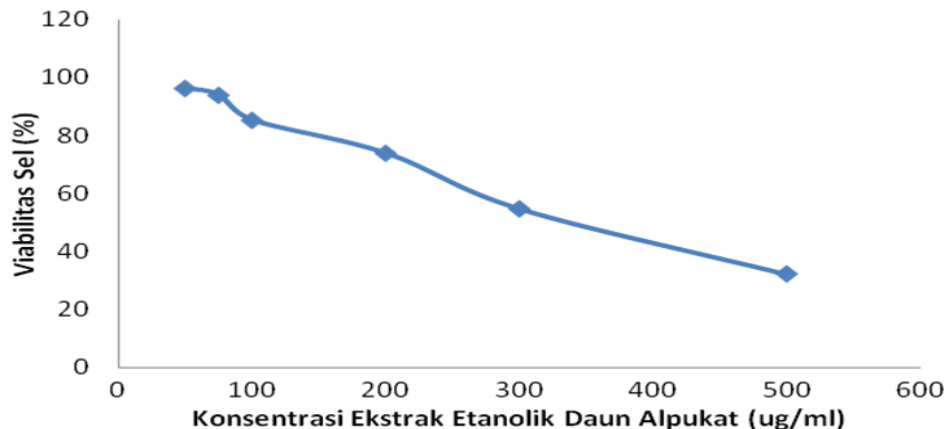
Uji sitotoksik

Uji sitotoksitas dilakukan dengan menggunakan metode MTT Assay. Sel HeLa didistribusikan pada 96-well plate dengan jumlah 10 x 10³ sel /sumuran. Sel diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator CO₂ kemudian ditambahkan 100 µL media kultur yang mengandung sampel dalam berbagai seri konsentrasi sebanyak 3 replikasi dan diinkubasi kembali selama 24 jam. Sebagai kontrol digunakan kontrol pelarut (DMSO), kontrol sel HeLa, dan kontrol media kultur (DMEM). Pada akhir inkubasi, media kultur yang ada dalam plate dibuang kemudian dicuci dengan PBS. Selanjutnya masing masing sumuran ditambah 100 µL reagen MTT, inkubasi lagi selama 3 jam pada suhu 37°C 5 % CO₂. Setelah 3 jam, ditambahkan larutan 10 % SDS dalam 0,1 N HCl. Sel diinkubasi semalam pada suhu kamar dan terlindung dari cahaya, kemudian, plate digoyang horizontal (dengan shaker) selama 10 menit kemudian dibaca dengan ELISA reader (BioRad) pada λ 595 nm.

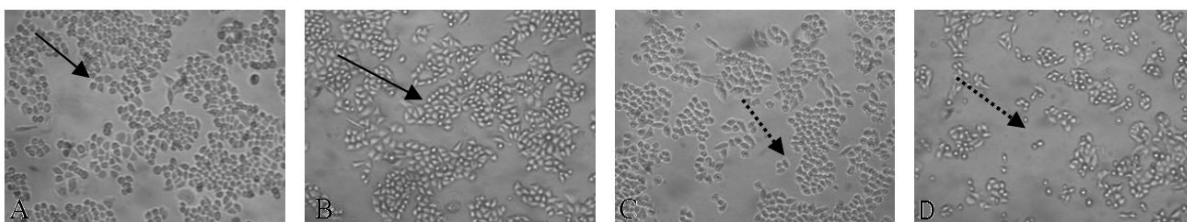
HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji sitotoksik memberikan gambaran potensi senyawa uji dalam menghambat pertumbuhan sel uji. Parameter yang digunakan adalah *inhibition concentration* 50% (IC₅₀). Semakin kecil IC₅₀ semakin berpotensi senyawa uji dalam menghambat pertumbuhan sel.

Hasil uji sitotoksik memperlihatkan bahwa ekstrak etanolik daun alpukat memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa yang tergantung dosis (*dose dependent*). Semakin meningkat konsentrasi ekstrak etanolik daun alpukat yang diberikan semakin rendah persen viabilitas sel



Gambar 1. Grafik uji sitotoksik ekstrak etanolik daun alpukat terhadap sel HeLa



Gambar 2. Morfologi sel HeLa pada perlakuan ekstrak etanolik daun alpukat.

Kelompok kontrol sel (A), konsentrasi 50µg/mL (A), konsentrasi 100µg/mL (B), konsentrasi 300µg/mL (C), dan konsentrasi 500µg/mL (D). Perlakuan senyawa uji mampu menurunkan viabilitas sel berbanding lurus dengan kenaikan konsentrasi ekstrak etanolik daun alpukat. Tanda (→) menunjukkan morfologi sel normal, tanda (⇝) menunjukkan morfologi sel yang mengalami kematian

(Gambar 1). Berdasarkan perhitungan dengan menggunakan analisis regresi linear diperoleh hasil bahwa ekstrak etanolik daun alpukat memiliki nilai IC_{50} sebesar 360µg/mL pada sel HeLa.

Aktivitas sitotoksik ekstrak etanolik daun alpukat yang tergantung konsentrasi dapat pula dilihat berdasarkan perubahan morfologi sel secara mikroskopis. Perubahan morfologi sel terjadi secara signifikan seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanolik daun alpukat. Morfologi sel HeLa akibat perlakuan ekstrak etanolik daun alpukat juga memberikan perubahan yang bermakna dengan sel tanpa perlakuan (sel kontrol). Sel HeLa normal berbentuk lonjong dan melekat pada dasar sumuran. Perlakuan senyawa uji memberikan perubahan morfologi sel HeLa berupa sel yang bentuknya bulat dan mengapung. Perubahan morfologi tersebut menunjukkan bahwa sel HeLa mengalami kematian (Gambar 2).

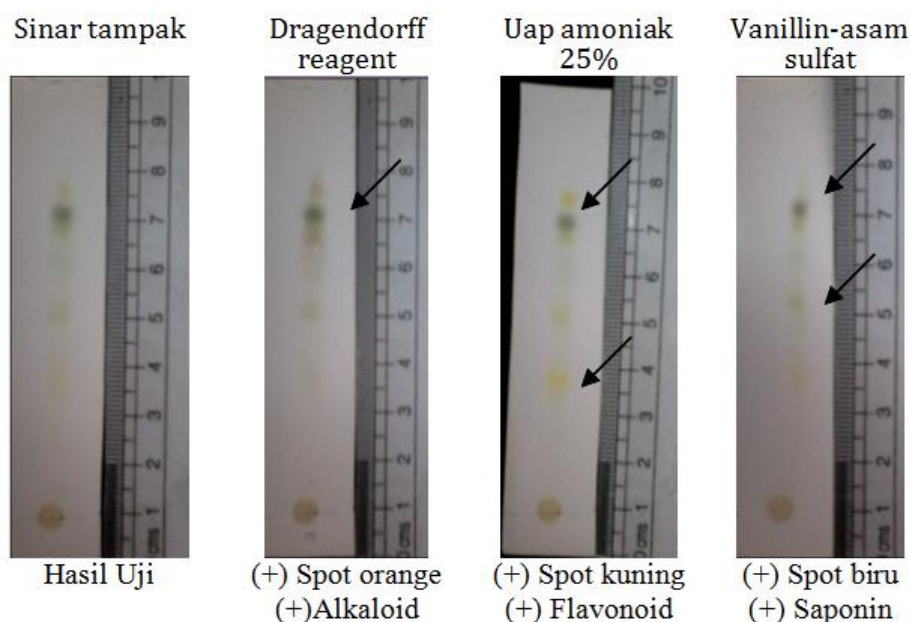
Analisis kualitatif secara kromatografi lapis tipis dilakukan terhadap tiga senyawa utama daun alpukat, yaitu alkaloid, flavonoid, dan saponin, yang diduga memiliki aktivitas yang terkait

dengan potensi antikanker. Penelitian terdahulu menyatakan buah dan daun mengandung saponin, alkaloid, dan flavonoid. Buah juga mengandung tanin dan daun mengandung polifenol, quersetin, gula alkohol persiit (Arisandi dan Andriani, 2009).

Hasil kromatografi lapis tipis menunjukkan ekstrak etanolik daun alpukat mengandung flavonoid, saponin, dan alkaloid (Gambar 3)

Flavonoid merupakan senyawa di dalam tumbuhan yang telah terbukti dapat menghambat proliferasi beberapa sel kanker yang memiliki toksisitas yang rendah atau bahkan tidak toksik untuk sel normal. Mekanisme flavonoid sebagai antiproliferatif sel kanker dapat melalui beberapa mekanisme. Mekanisme tersebut antara lain aktivasi senyawa karsinogen, antiproliferasi sel, *cell cycle arrest*, menginduksi apoptosis dan diferensiasi sel, menghambat angiogenesis, dan antioksidan (Ren *et al*, 2003).

Quercetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) merupakan salah satu flavonoid yang mempunyai efek sebagai antikanker dengan berbagai macam mekanisme aksi. Quercetin diketahui dapat menyebabkan *checkpoint* pada kedua fase G_1/S dan G_2/M pada kultur sel kanker hingga terjadi *cell*



Gambar 3. Hasil Analisis Kualitatif Ekstrak Daun Alpukat dengan Kromatografi Lapis Tipis
Keterangan : Uji KLT menggunakan fase diam silika gel F₂₅₄, fase diam Toluena-etil asetat-trimetilamin (70:20:10)

cycle arrest. Flavonoid dapat menginduksi apoptosis pada beberapa *cell line* kanker. Mekanisme induksi apoptosis yang dimiliki antara lain menghambat aktivitas topoisomerase DNA I/II, penurunan ROS (*reactive oxygen species*), regulasi ekspresi *heat shock protein*, modulasi jalur apoptosis, aktivasi caspase-9 dan caspase-3, penurunan ekspresi faktor transkripsi nukleus kappaB (NF-kappaB), aktivasi endonuklease, dan penurunan protein Mcl-1 (Ren *et al.*, 2003).

Senyawa alkaloid juga memiliki peranan dalam penghambatan pertumbuhan sel kanker, misalnya senyawa vinkristin dan vinblastin yang terdapat pada daun tapak dara. Senyawa ini berperan sebagai *antimitotic agent* dengan mengikat dimer tubulin yang dapat mengganggu munculnya mikrotubul pada saat metafase, akibatnya proses mitosis sel akan terganggu, sehingga proliferasi sel kanker terhambat (Ewesuedo dan Ratain, 2003; Dewi dan Saraswati, 2009).

Kemungkinan mekanisme sitotoksik yang menyebabkan induksi kematian sel kanker HeLa oleh senyawa pada ekstrak etanolik daun alpukat tersebut masih perlu dibuktikan melalui penelitian-penelitian selanjutnya. Senyawa yang secara pasti bertanggung jawab atas mekanisme tersebut juga masih perlu di teliti lebih lanjut untuk mendapatkan dasar ilmiah yang jelas dalam pengembangan senyawa aktif dalam daun alpukat sebagai agen kemopreventif.

KESIMPULAN

Ekstrak etanolik daun alpukat berdasarkan uji kromatografi lapis tipis mengandung senyawa flavonoid, saponin, dan alkaloid. Hasil uji sitotoksik menunjukkan ekstrak etanolik daun alpukat memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan sel kanker leher rahim HeLa dengan nilai IC₅₀ 360 µg/ml

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih kepada DIKTI melalui Hibah Penelitian Dosen Pemula atas dana yang diberikan untuk penelitian ini serta Poltekkes Bhakti Setya Indonesia dan *Cancer Chemoprevention Research Center* (CCRC) atas bantuan dan fasilitas yang telah diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Arisandi, Y, dan Andiriani, Y. 2009. *Khasiat Berbagai Tanaman Untuk Pengobatan*. Eska media, Jakarta
- Asaolu, M.F., Asaolu, S.S., Fakunle, J.B., B.O. Emman, Okon, Ajayi E.O., and Togun, R.A., 2010, Evaluation of in-vitro Antioxidant Activities of Methanol Extracts of *Persea americana* and *Cnidoculus aconitifolius*, *Pakistan Journal of Nutrition*, 9 (11): 1074-1077
- Davis, J.M., Navolonic, P.M., Weinstein, C.R., Steelman, L.S., Hu, W., Konovlepa, M., Blagosklonny, M.V., and McCubrey, J.A.,

- 2003, Raf and Bcl-2 Induce Distinct and Common Pathway That Contribute to Breast Cancer Drug Resistance, *Clin. Canc. Res.*, 9:1161-1170
- Dewi, UT dan TR Saraswati. 2009. Efek Rebusan Daun Tapak Dara pada Dosis dan Frekuensi yang Berbeda terhadap Kerusakan dan Akumulasi Glikogen pada Hepar Mencit (*Mus musculus*). *BIOMA* 11 (1) : 1-5
- Ewesuedo R B and M J Ratain. 2003. Principle of Cancer Chemotherapy. *Oncologic Therapies*. Edited by : Everett E.V and Harvey M.G. Springer : Berlin. p: 44
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C. and Thun, M.J., 2008, Cancer statistics, *Cancer J. Clin.*; 56(2):106-130.
- Katja, D.G., Suryanto, E., dan Wehantouw, F., 2009, Potensi Daun Alpukat (*Persea Americana* Mill) Sebagai Sumber Antioksidan Alami, *Chem. Prog.* 2 (1) : 58-64.
- Oemiati, R., Rahajeng, E, dan , Yudi K., 2011, Prevalensi Tumor Dan Beberapa Faktor Yang Mempengaruhinya di Indonesia, *Bul. Penelit. Kesehat*, 39 (4) : 190 – 204.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., and Zhang, L., 2003, Flavonoids: Promising Anticancer Agents, *Medicinal Research Review*, 23 (4): 519-53