

INTISARI

Alpukat (*Persea americana* Mill.) dikenal sebagai tanaman buah yang hampir semua bagian tanamannya secara empiris digunakan sebagai obat tradisional. Biji alpukat diketahui mengandung senyawa bioaktif yang bersifat antiinflamasi, antibakteri, penurun kolesterol, dan hipotensif. Kajian tentang kandungan kimia biji alpukat yang bersifat sitotoksik masih belum banyak dilakukan. Dalam rangka eksplorasi senyawa aktif dari tumbuhan untuk mencari obat kanker baru, isolasi dan identifikasi senyawa aktif dari biji alpukat yang bersifat sitotoksik pada sel kanker payudara perlu dilakukan. Tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi senyawa sitotoksik biji alpukat dan menentukan aktivitas senyawa aktif tersebut pada siklus sel dan apoptosis dengan mengkaji pengaruh senyawa aktif terhadap ekspresi gen p53, pRB, caspase 3, caspase-9, Bcl-2 dan Bax dari sel MCF-7 secara *in vitro*.

Isolasi senyawa aktif dilakukan dengan metode *Bioassay Guided Fractination*. Monitoring dilakukan dengan KLT dan *MTT assay*. Biji alpukat diperoleh dari pohon alpukat koleksi Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan Obat Tradisional Tawangmangu yang tumbuh di kebun percobaan pada ketinggian 1.200 m dpl. Ekstraksi serbuk kering biji alpukat dilakukan secara maserasi bertingkat, berturut turut dengan kloroform, metanol dan air. Ekstrak yang paling aktif yaitu ekstrak kloroform (EKBP) difraksinasi dengan kromatografi vakum kolom dengan gradien eluen mulai dari tingkat polaritas rendah ke tinggi menghasilkan 19 fraksi. Fraksi dengan profil KLT yang mirip digabung sehingga menghasilkan 7 fraksi gabungan. Selanjutnya dipilih fraksi gabungan 6 untuk pemisahan senyawa aktif karena memiliki aktivitas sitototoksik yang tinggi. Kemudian dilakukan kromatografi kolom untuk memisahkan golongan senyawa aktif dan diperoleh 4 fraksi. Fraksi F6.3 dipurifikasi dengan KLT preparatif dengan eluen n-heksan:etil asetat (6:4;v/v) dan diperoleh 4 isolat aktif, namun karena isolat 3 dan 4 jumlahnya sangat sedikit sehingga tidak memungkinkan untuk dianalisis lanjut. Senyawa yang didapatkan diuji kemurniannya secara KLT dengan beberapa kombinasi eluen, selanjutnya dilakukan uji sitotoksik dengan *MTT assay* serta uji aktivitas penghambatan siklus sel dan apoptosis menggunakan *Flow cytometry*. Apoptosis dianalisis dengan *Flow cytometry* menggunakan reagen pendeteksi PI dan Annexin-V, dan juga melalui pengamatan fragmentasi DNA sel MCF-7. Ekspresi gen p53, pRB, caspase 3, caspase-9, Bcl-2 dan Bax dideteksi menggunakan metode immunositokimia dan dianalisis secara semikuantitatif menggunakan *Allred scoring*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa biji alpukat (*Persea americana* Mill.) mengandung senyawa yang bersifat sitotoksik terhadap sel MCF-7. Hasil uji sitotoksitas kedua senyawa terhadap sel MCF-7 masing-masing IC_{50} adalah $18,67 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$ dan $16,35 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$. Berdasarkan analisis siklus sel MCF-7, perlakuan senyawa aktif 1 mampu menghambat siklus sel pada fase G0-G1 sebesar 54,3%, sedang senyawa aktif 2 mampu menurunkan jumlah sel pada fase G2-M sebesar 15,7%.

Kedua senyawa juga mampu menginduksi apoptosis sel MCF-7 karena terbukti meningkatkan ekspresi p53, pRb, caspase-9, dan mampu menekan



ekspresi gen antiapoptosis Bcl-2 dan meningkatkan ekspresi gen pro-apoptosis Bax. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa 2 senyawa sitotoksik biji alpukat (*Persea americana* Mill) yang diperoleh berpotensi memodulasi siklus sel serta mampu menginduksi apoptosis sel kanker payudara MCF-7.

Kata kunci: *Persea americana*, biji, sitotoksik, MCF-7, apoptosis, siklus sel.

ABSTRACT

Avocado (*Persea americana* Mill.) is known as a fruit plant that almost all parts of the plant are empirically used as a traditional medicine. Avocado seeds are known to contain bioactive compounds that are anti-inflammatory, antibacterial, cholesterol-lowering, and hypotensive. Studies of the chemical content of avocado seeds that are cytotoxic are still not widely practiced. In order to explore the active compounds of plants in search of new cancer drugs, the isolation and identification of active compounds from cytotoxic avocado seeds on breast cancer cells is necessary. The aim of this study was to isolate and identify the cytotoxic compounds in avocado seeds and to study the activity of the active compound in the cell cycle and apoptosis by studying the effect of the active compound on the expression of p53, pRB, caspase 3, caspase-9, Bcl2 and Bax genes of MCF-7 in vitro.

Isolation of active compound was done by Bioassay Guided Fractionation method. Monitoring is done by TLC and MTT assay. Avocado seeds obtained from avocado trees collected in Kalisoro Research Garden of Medicinal Plants and Traditional Medicine Research and Development Centre, with the altitude of 1.200 m above sea levels. The extraction of dried powdered avocado seeds was performed by maceration, respectively with chloroform, methanol and water. The most active extracts of chloroform extract (EKBP) were fractionated by column vacuum chromatography with eluent gradients ranging from low to high polarity yielded 19 fractions. Fractions with similar TLC profiles are combined to produce 7 combined fractions. Furthermore, the combined fraction 6 is selected for the separation of the active compound because it has high cytotoxic activity. Then performed column chromatography to separate the class of active compounds and obtained 4 fractions. Fraction F6.3 was purified by preparative TLC with eluent n-hexane: ethyl acetate (6: 4, v / v) and obtained 4 active isolates, but because isolates 3 and 4 were very small so it was not possible to further analyze. The cytotoxicity test was performed with an MTT assay. Analysis of cell cycle inhibition and apoptotic activity were carried out using Flow cytometry. Apoptosis was analyzed by Flow cytometry using PI and Annexin-V detection reagents, as well as through the observation of DNA fragmentation of MCF-7 cell. Expression of p53, pRB, caspase 3, caspase-9, Bcl2 and Bax genes was detected using immunocytochemistry methods and semi-quantitatively analyzed using Allred scoring.

The results showed that avocado seed (*Persea americana* Mill.) were contained cytotoxic compounds against MCF-7 cells in vitro. The two cytotoxic compounds have IC₅₀ i.e. $18,67 \pm 0,13 \mu\text{g} / \text{mL}$ and $16,35 \pm 0,17 \mu\text{g} / \text{mL}$ respectively. The result of cell distribution test of MCF-7 for both compounds in the cell cycle showed that the active compound 1 was able to inhibit the cell cycle in G₀-G₁ phase of 54,3%, while the active compounds 2 was able to increase the number of cells in G₂-M phase of 15,7%.

The two compounds also proved capable of inducing apoptosis of MCF-7 cells and capable of increasing expression of p53, pRb, caspase-9, caspase-3, and able to suppress the expression of the Bcl-2 antiapoptotic gene and increase the expression of cell pro-apoptotic genes namely Bax. From the results of the study it can be concluded that the cytotoxic compound of avocado seed (*Persea americana*

Mill) obtained were potentially able to modulate the cell cycle and able to induce apoptosis of MCF-7 breast cancer cells.

Keywords: *Persea americana*, seed, cytotoxic, MCF-7, apoptosis, cell cycle.