

SITOTOKSISITAS EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI-FRAKSI DAUN PEPAYA (*Carica papaya L.*) TERHADAP SEL KANKER PROSTAT DU 145 DENGAN METODE MTT ASSAY

CYTOTOXICITY OF ETHANOL EXTRACT AND FRACTION PAPAYA LEAF (*Carica papaya L.*) ON PROSTATE CANCER CELLS DU 145 USING MTT ASSAY METHOD

Hesti Renggana^{1*}, Asman Sadino¹, Risa Susanti¹, Rahmi¹, Dani Sujana²

¹Program Studi Farmasi, Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Garut

Jl. Jati No. 42B, Tarogong Kaler, Garut, Jawa Barat, 44151, Indonesia

²Program Studi Diploma Farmasi, STIKes Karsa Husada Garut

Jl. Subyadinata No.7, Tarogong Kidul, Garut, Jawa Barat, 44151, Indonesia

*Email Corresponding: hesti@uniga.ac.id

Submitted : 7 April 2022

Revised : 21 April 2022

Accepted: 25 Mei 2022

ABSTRAK

Kanker prostat merupakan merupakan kanker yang paling umum diderita oleh pria selama 2016, kasus baru pada penderita kanker prostat sudah diperkirakan sebanyak 180.890 dan kasus kematian 26.120 kasus. Terapi yang sering digunakan pada penderita kanker prostat ini salah satunya adalah kemoterapi. Kemoterapi dapat menyebabkan senyawa antikanker tidak sensitif, karena terjadi resistensi sel kanker. Maka dari itu, diperlukan pula metode alternatif pengobatan tradisional atau herbal. Dalam terapi kanker, penggunaan tanaman herbal dinilai memiliki efek samping yang lebih kecil dibandingkan dengan terapi menggunakan obat-obat kimia. Daun pepaya (*Carica papaya L.*) merupakan salah satu tumbuhan yang telah diteliti memiliki aktivitas sitotoksik *MiaPaca-2* dan *ASPC-1*. Dalam penelitian ini, dilakukan uji sitotoksitas ekstrak etanol dan fraksi-fraksi daun pepaya (*Carica papaya L.*) terhadap sel kanker DU 145 untuk mengetahui aktivitas antikanker dengan menggunakan metode MTT Assay. Hasil uji sitotoksitas terhadap sel kanker prostat DU 145 menunjukkan ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dengan berbagai konsentrasi 31.25, 62.5, 125, 250, dan 500 µg/mL. Fraksi N-heksan memiliki nilai IC₅₀ sebesar 2,80 µg/mL dengan kategori sangat aktif. Hasil aktivitas sitotoksik tersebut dibuktikan dari hasil penafisan fitokimia dari daun pepaya. Metabolit sekunder yang bersifat nonpolar seperti alkaloid pada penafisan fitokimia memperoleh hasil positif. Hal ini membuktikan bahwa alkaloid (*carpaine*) berkhasiat melawan kanker. Sedangkan pada fraksi air dengan nilai IC₅₀ sebesar 398 µg/mL, fraksi etil asetat sebesar 134 µg/mL dan ekstrak etanol daun pepaya memiliki nilai IC₅₀ sebesar 151 µg/mL bersifat cukup aktif terhadap sel DU 145.

Kata kunci : *Carica papaya*, Kanker prostat, MTT, Sitotoksitas

ABSTRACT

Prostate cancer was the most common cancer suffered by men during 2016, new cases in prostate cancer patients were estimated at 180,890 cases and 26,120 deaths. One of the therapies used in prostate cancer patients is chemotherapy. Chemotherapy can cause insensitive anticancer compounds, because of the resistance of cancer cells. Therefore, alternative methods of traditional or herbal medicine are also needed. In cancer therapy, the use of herbal plants is considered to have fewer side effects than therapy using chemical drugs. Papaya leaf (*Carica papaya L.*) is one of the plants that has been studied to have cytotoxic activity of *MiaPaca-2* and *ASPC-1*. In this study, a cytotoxicity test of ethanol extract and

papaya leaf fraction (Carica papaya L.) was carried out on DU 145 cancer cells to determine anticancer activity using the MTT Assay method. Cytotoxicity test results on prostate cancer cells DU 145 showed ethanol extract, n-hexane fraction, ethyl acetate fraction, and water fraction with varying concentrations of 31.25, 62.5, 125, 250, and 500 g/mL. The N-hexane fraction has an IC₅₀ value of 2.80 g/mL with a very active category. The results of cytotoxic activity were proven from the results of phytochemical screening from papaya leaves. Nonpolar secondary metabolites such as alkaloids on phytochemical screening obtained positive results. This proves that the alkaloid (carpaine) is efficacious against cancer. Meanwhile, the water fraction with an IC₅₀ value of 398 g/mL, the ethyl acetate fraction 134 g/mL and the ethanol extract of papaya leaves had an IC₅₀ value of 151 g/mL which was quite active against DU 145 cells.

Keywords: *Carica papaya, Prostate cancer, MTT, Cytotoxicity*

PENDAHULUAN

Neoplasma maligna yang menyerang kelenjar prostat disebut kanker prostat. Terapi operasi (radiasi) dapat menyembuhkan kanker prostat yang terlokalisasi tetapi tidak dapat menyembuhkan kanker prostat lanjut (Beheshti *et al.*, 2018). Kanker prostat merupakan kanker yang paling umum di derita oleh pria selama 2016, kasus baru pada penderita kanker prostat diperkirakan sebanyak 180.890 dan kasus kematian 26.120 kasus (Fauci *et al.*, 2011). Di Indonesia, prevalensi kanker prostat tahun 2013 adalah sebesar 0,2% diperkirakan sebanyak 25.120 penderita (Kementrian Kesehatan RI, 2015).

Adapun beberapa cara penyembuhan kanker prostat adalah pembedahan, radioterapi, terapi hormonal dan kemoterapi. Jenis terapi dilakukan berdasarkan stadium keparahan kanker yang di alami oleh penderita (Umbas *et al.*, 2017). Namun selain terapi medis, ada pula pengobatan menggunakan metode tradisional atau herbal. Dalam terapi kanker, efek samping penggunaan herbal lebih kecil dibandingkan dengan terapi obat kimia. Hal ini menjadi dasar bagi peneliti untuk mengembangkan obat antikanker yang berasal dari tanaman (Greenwell and Rahman, 2015).

Daun pepaya (*Carica papaya L.*) merupakan tanaman yang berasal dari Meksiko bagian selatan dan bagian utara dari Amerika Selatan. Saat ini tanaman pepaya telah menyebar luas dan banyak ditanam di seluruh daerah tropis untuk diambil buahnya. Tanaman pepaya diberi nama lokal, yaitu gedang (Sunda) dan Kates (Jawa). Kandungan senyawa daun pepaya terdiri dari flavonoid (*kaemferol dan myricetin*), alkaloid (*carpaine, pseudocarpaine, dehydrocarpaine I dan II*), Fenol (*ferulic acid, caffeic acid, chlorogenic acid*) (Yogiraj *et al.*, 2015). Kandungan daun pepaya yang berkhasiat melawan kanker adalah senyawa alkaloid atau saponin yang dominan menyumbang rasa pahit pada daun pepaya. Senyawa-senyawa tersebut berperan sebagai antoksidan, antibakteri, anti peradangan dan anti kanker (Fitria *et al.*, 2013).

Dari beberapa penelitian yang pernah dilakukan menggunakan metode MTT Assay menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun pepaya pada konsentrasi 100 µg/mL memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker pankreas *MiaPaCa-2 dan ASPC-1* dengan jumlah sel hidup masing-masing sebesar 18,96% dan 45,94%.⁸ Pada sel MCF-7 menggunakan sampel daun pepaya dengan ekstrak etanol 96% dengan IC₅₀ sebesar 9,73 µg/mL (Hariyanti, 2018). Penelitian lain yang juga menggunakan metode MTT Assay pada sampel daun pepaya dengan fraksi kloroform yang menginduksi apoptosis pada sel kanker myeloma dan IC₅₀ sebesar 104,4 µg/mL (Hariyanti, 2018).

Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan penelitian tentang efek sitotoksik ekstrak etanol dan berbagai fraksi dari daun pepaya (*Carica papaya L.*) pada sel kanker prostat DU 145 dengan metode MTT assay. Metode MTT assay relatif cepat, sensitif, akurat, digunakan untuk mengukur sampel dalam jumlah besar dan hasilnya bisa untuk menentukan sifat sitotoksik suatu bahan (Zeng *et al.*, 2017). Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek sitotoksik dari ekstrak etanol dan berbagai fraksi daun pepaya (*Carica papaya L.*) sebagai antikanker. Manfaat dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi ilmiah mengenai

aktivitas dari ekstrak etanol dan berbagai fraksi daun pepaya (*Carica papaya* L.) sebagai antikanker terhadap sel kanker prostat DU 145.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah satu set alat destilasi, satu set alat rotary evaporator, lumpang, neraca analitik, vial, corong pisah, erlenmeyer, *beker glass*, *waterbath*, corong, gelas ukur (10 ml dan 100 ml), *Laminar Air Flow Cabinet (L AFC)*, pipet mikro (10, 200, 1000 μ L), oven, sentrifugator, mikroskop, inkubator CO₂ 5%, mikroskop inferted, *culture flask*, seropipet (2 ml, 5 ml, 10 ml), *falcon tube* (15 ml, 50 ml), *liquid nitrogen tank*, *96-well plate*, *microtip (yellow, blue)*, *ELISA reader*, *microtube Eppendorf*.

Bahan yang digunakan adalah etanol, *n*-heksan, etil asetat, aquadest, asam asetat anhidrat, kloroform, kloroform amoniak, logam magnesium, larutan FeCl₃, HCl 1%, H₂SO₄ 2N, pereaksi Mayer, dragendroff, RPMI, FBS, Penstrep, Trypsin EDTA, Trypan blue, MTT reagen, DMSO stop reaksi, DMSO pelarut ekstrak dan sel kanker prostat DU 145.

Sampel yang digunakan adalah daun pepaya (*Carica papaya* L.) yang diambil dari daerah Warung Peuteuy, Banyuresmi, Garut, Provinsi Jawa Barat.

Prosedur Penelitian

Determinasi

Pengujian identifikasi/determinasi sampel tumbuhan pepaya (*Carica papaya* L.) dilakukan di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung (ITB).

Preparasi sampel

Sampel yang diperoleh selanjutnya dilakukan dengan proses pengolahan sampel yang dimulai dengan sortasi basah, pencucian, pengeringan, sortasi kering, uji karakteristik dan Penapisan Fitokimia.

Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstraksi dengan cara maserasi mengikuti prosedur [Sujana et al \(2020\)](#). Sampel dimasukkan ke dalam botol gelap lalu dilakukan maserasi. Maserasi dilakukan selama tiga kali 24 jam. Sebanyak 250 gram simplisia ditimbang dan ditambah dengan 1250 mL etanol, kemudian dimaserasi selama satu hari kemudian disaring dengan kain flannel dan kertas saring. Residu yang diperoleh dimaserasi kembali dengan etanol 750 mL selama satu hari, kemudian residu kedua hasil dari maserasi ini dimaserasi kembali dengan etanol 96% 500 mL selama satu hari. Ekstrak cair atau filtrat yang diperoleh dari proses maserasi di atas, dipekatkan dengan alat penguap vakum putar (*rotary evaporator*) dan diuapkan di atas *waterbath* sehingga diperoleh ekstrak kental dengan bobot tetap.

Metode yang dilakukan dalam fraksinasi pada penelitian ini adalah ekstraksi cair-cair (ECC) sesuai prosedur [Nurul et al \(2022\)](#) dengan modifikasi. Sejumlah ekstrak kental dilarutkan dengan aquades sebanyak 500mL. Kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Selanjutnya ditambahkan pelarut *n*-heksan sebanyak 500 mL atau dengan perbandingan air : *n*-heksan yaitu 1 : 1. Kemudian dilakukan pengocokkan hingga campuran menjadi satu fasa. Setelah itu campuran dibiarkan hingga terbentuk 2 fasa yang saling tidak bercampur. Fraksi air diambil dan ditampung. Kemudian ditambahkan kembali pelarut *n*-heksan hingga diperoleh fraksi *n*-heksan yang hampir bening. Setelah itu, fraksi air ditambahkan dengan pelarut etil asetat sebanyak 500 mL atau dengan perbandingan volume 1 : 1. Dilakukan prosedur yang sama seperti fraksi *n*-heksan. Kemudian dari tiap fraksi diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* dan penangas air hingga diperoleh fraksi kental.

Uji Aktivitas Antikanker

Pembuatan Larutan Sediaan Uji

Sampel di timbang 40 mg dan dilarutkan dalam 1 mL DMSO (konsentrasi larutan stok 40000 µg/mL). Selanjutnya pembuatan larutan 5 seri konsentrasi yaitu 500; 250; 125; 62.5; dan 31.25 µg/mL. Larutan induk tersebut ditambahkan dengan medium RPMI ke dalam tabung eppendorf yang telah steril dan telah ditandai dengan marker pen. Pengerjaan dilakukan di *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC) dengan aseptis.

Preparasi Sel

Thawing dan Penumbuhan Sel Kanker DU-145

Proses *thawing* dimulai dengan mengambil sel kanker DU 145 dari liquid nitrogen tank secara steril, kemudian vial dicelupkan ke dalam *waterbath* pada suhu 37°C selama 2 menit. Setelah 2 menit, vial dikeluarkan dari *waterbath* dan dikeringkan menggunakan kasa alkohol. Kemudian vial dibawa ke *laminar air flow cabinet*.

Sel dipipet sebanyak 1 mL kemudian dipindahkan dalam tabung sentrifugasi berisi 9 mL RPMI dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 1500 rpm. Hasil sentrifugasi berupa supernatan dan pelet, yang mana lapisan supernatan dibuang dan menyisakan bagian pelet. Selanjutnya lapisan lapisan pellet dipipet 1 mL dan buat suspensi dalam 10 mL medium sel yang diletakkan dalam flask T dan diinkubasi dalam inkubator 5% CO₂ pada suhu 37°C.

Subkultur Sel Kanker DU - 145

Sel siap di subkultur jika telah mencapai tingkat kepadatan 80-90 % pada pengamatan di bawah mikroskopi inverted. Media pada sel kemudian dibuang dan ditambahkan PBS. Selanjutnya dilakukan pengadukan dan PBS dibuang. Kemudian ditambahkan trypsin-EDTA ke dalam flask T dan diinkubasi flask T dalam inkubator CO₂ 5% selama 5 menit. Langkah selanjutnya ditambahkan FBS 10% dan disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit, kemudian terbentuk 2 lapisan, lapisan supernatan dibuang dan lapisan pelet dibuat suspensi dalam 5 mL medium RPMI.

Perhitungan dan Pindahkan sel kanker DU 145 ke dalam Well Plate

Suspensi sel diambil dan ditambahkan Trypan Blue. Kemudian diamati dan dihitung jumlah sel dengan cara sel dipipetkan ke hemositometer. Selanjutnya sel dihitung di bawah mikroskop inverted atau mikroskop cahaya dengan counter: Hemositometer terdiri dari 4 kamar hitung. Setiap kamar hitung memiliki 16 kotak. Hitung sel pada 4 kamar hemositometer. Sel yang gelap (mati) dan sel yang berada dibatas luar di sebelah atas dan di sebelah kanan tidak ikut dihitung. Sel di batas kiri dan batas bawah ikut dihitung.

Hitung jumlah sel per mL dengan rumus dibawah ini:

$$\text{Jumlah sel} = \frac{\text{jumlah sel dalam 4 bilik} \times \text{jumlah pengenceran}}{4} \times 10^4 \text{ sel/mL}$$

Cara perhitungan jumlah total sel yang diperlukan:

$$\text{Volume panen sel} = \frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel hitung/mL}} \times \text{volume sel}$$

Perletakkan Sel

Masing-masing sebanyak 50 µL suspensi sel diambil dan diletakkan di dalam *well plate* yang telah ditandai dengan marker pen sesuai konsentrasi pengujian. Setelah itu suspensi sel tersebut diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C dan setelah itu sel siap diperlakukan. *Well plate* yang telah berisi sel kanker dikeluarkan dari inkubator. Selanjutnya ditambahkan doxorubicin pada kelompok kontrol positif, pada kelompok uji ekstrak etanol dan fraksi-fraksi dari daun pepaya dari berbagai seri konsentrasi (500; 250; 125; 62.5; 31.25 µg/mL) sebanyak 100 µL dimasukkan ke dalam tiap sumuran. Selain itu di dalam sumuran juga dimasukkan blanko berupa DMSO, kontrol berupa media dan sel uji. Waktu inkubasi dilakukan selama 24 jam. Selanjutnya, ditambahkan 10 µL reagen MTT pada masing-masing *well plate* dan inkubasi di dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 4 jam. DMSO sebanyak 200 µL ditambahkan ke masing-masing sumuran untuk melarutkan formazan. Kemudian absorban diukur dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang uji 550 nm pada waktu 24 jam (Anonim, 2009).

Analisis Data

Viabilitas sel adalah jumlah sel-sel yang mampu berkembang dalam medium kultur. Poliferasi sel adalah fase sel saat mengalami pengulangan siklus sel tanpa hambatan. Rumus untuk menghitung poliferasi sel:

$$\text{poliferasi sel (\%)} = \frac{A-B}{C-B} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Rata-rata absorbansi perlakuan (bahan uji)

B = Rata-rata absorbansi media

C = Rata-rata absorbansi kontrol (media + sel)

Setelah didapat nilai % poliferasi , selanjutnya dibuat grafik dengan diplotnya data untuk sumbu x adalah log konsentrasi dan sumbu y adalah % poliferasi. Dari persamaan regresi tersebut ditentukanlah nilai IC₅₀.

Adapun rumus persamaan regresi berupa : $y = bx + a$

Keterangan:

y = nilai 50 menghambat kematian

b = slope

x = nilai IC₅₀

a = intersep

Berdasarkan klasifikasi aktivitas sitotoksik ekstrak terhadap sel kanker dapat digolongkan kategori sangat aktif jika nilai IC₅₀ < 10 µg/mL, kategori aktif jika nilai IC₅₀ 10-100 µg/mL, dan kategori cukup aktif jika nilai IC₅₀ 100-500 µg/mL dan dan tidak aktif (> 500 µg/mL) (Weerapreeyakul *et al.*, 2012).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan daun pepaya (*Carica papaya* L.) tanaman yang berasal dari Warung Peuteuy, Kec. Banyuresmi, Kab. Garut, Provinsi Jawa Barat. Tanaman daun pepaya (*Carica papaya* L.) yang diperoleh dideterminasi di Herbarium Bandungense, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung (ITB). Tujuan dilakukan determinasi untuk memastikan kesesuaian identitas dari suatu tumbuhan.

Simplisia daun pepaya yang diperoleh selanjutnya dilakukan pemeriksaan karakteristik simplisia untuk mengetahui keamanan dari suatu simplisia. Karakteristik simplisia meliputi pemeriksaan kadar air, susut pengeringan, penetapan kadar abu, penetapan kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, penetapan kadar abu total, kadar abu larut air, dan kadar abu tidak larut asam. Susut pengeringan yang diperoleh dari simplisia daun pepaya yaitu sebesar 12%, sehingga dapat disimpulkan bahwa hasil yang didapatkan memenuhi standar persyaratan. Susut pengeringan dilakukan untuk mengetahui besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Susut pengeringan biasanya lebih besar dari kadar air.

Hasil dapat dilihat pada [Tabel I](#)

Tabel I. Hasil Pemeriksaan Karakteristik Simplisia Daun Pepaya (*Carica papaya* L.)

Karakteristik Simplisia	Daun Pepaya	Standar
Susut Pengeringan	12 % b/b	-
Kadar Air	8 % v/b	<10 %
Penetapan Kadar Sari Larut Air	30 % b/b	>30%
Penetapan Kadar Sari Larut Etanol	32 % b/b	>15 %
Penetapan Kadar Abu Total	1,6838 % b/b	≤12 %
Penetapan Kadar Abu Larut Air	1,2161 % b/b	<2 %
Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam	0,2806 % b/b	<1 %

Penetapan kadar air dilakukan untuk mengetahui besarnya kandungan air. Pemeriksaan kadar air digunakan dengan metode destilasi azeotrop. Kadar air dalam simplisia tidak boleh lebih dari 10%. Kadar air yang diperoleh pada pengujian simplisia daun pepaya sebesar 8%. Hasil yang didapatkan pada pengujian kadar air sampel sesuai syarat dan tidak melebihi susut pengeringan.

Penetapan kadar sari meliputi penetapan kadar sari larut air dan penetapan kadar sari larut etanol untuk mengetahui banyaknya senyawa yang dapat tersari oleh pelarut etanol atau air dari suatu simplisia. Hasil yang didapatkan pada penetapan kadar sari larut air daun pepaya yaitu sebesar 30%. Hasil penetapan kadar sari larut etanol daun pepaya yaitu sebesar 32%. Penentuan kadar abu total menunjukkan jumlah senyawa anorganik yang terdapat dalam simplisia baik secara fisiologis maupun non-fisiologis. Hasil yang diperoleh pada penentuan ini, menunjukkan kadar abu total daun pepaya yaitu sebesar 1,6838 %. Penetapan kadar abu larut air menunjukkan adanya kandungan logam fisiologis dalam suatu simplisia. Pada penelitian ini diperoleh kadar abu larut air daun pepaya yaitu 1,2161%. Selanjutnya pada pemeriksaan penetapan kadar abu tidak larut asam menunjukkan adanya senyawa logam non-fisiologis yang terdapat dalam tumbuhan. Pada penelitian kadar abu tidak larut asam diperoleh hasil yaitu sebesar 0,2806%. Kemudian dilakukan penapisan fitokimia simplisia dan ekstrak untuk mengetahui adanya kandungan senyawa yang terdapat dalam tanaman tersebut, pengujian ini untuk mengetahui adanya kandungan alkaloid, flavonoid, fenol, saponin, tanin, kuinon, dan steroid/triterpenoid. Hasil dapat dilihat pada [Tabel II](#).

Tabel II. Hasil Penapisan fitokimia Simplisia dan Ekstrak

Penapisan	Daun Pepaya	
	Simplisia	Ekstrak
Alkaloid	+	+
Flavonoid	+	+
Saponin	+	+
Tanin	+	+
Kuinon	+	+
Steroid/triterpenoid	+	+
Fenol	+	+

Keterangan : + Terdeteksi - Tidak Terdeteksi

Pada pengujian penapisan fitokimia simplisia dan ekstrak positif alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, kuinon dan steroid/triterpenoid serta fenol. Masing-masing sampel daun pepaya disortasi basah untuk memisahkan pengotor dan bagian tanaman lain yang terbawa pada saat pengambilan. Kemudian tanaman dicuci dan dikeringkan. Kemudian proses pengeringan dilakukan di lemari pengering jangan terkena cahaya matahari langsung. Selanjutnya daun pepaya yang telah dikeringkan dilakukan proses selanjutnya yaitu sortasi kering untuk dipisahkan dari pengotor yang masih terbawa pada saat proses pengeringan. Simplisia daun pepaya yang sudah kering dihaluskan dengan cara diblender hingga diperoleh bentuk serbuk simplisia.

Proses ekstraksi yang dilakukan yaitu maserasi. Simplisia yang digunakan sebanyak 3 kg, lalu diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% sampai semua bagian tanaman tersebut direndam 3x24 jam. Dengan penyaringan tiap 1 x 24 jam. Filtrat selanjutnya dipekatkan menggunakan penguap vakum putar untuk menghasilkan ekstrak kental. Ekstrak kental yang dihasilkan sebanyak 258,54 gram dari simplisia kering sebanyak 3 kg sehingga rendemen ekstrak yang diperoleh adalah 8,618%. Setelah mendapatkan ekstrak etanol kental, kemudian dilakukan fraksinasi. Fraksinasi bertujuan untuk menarik senyawa yang memiliki perbedaan kelarutan. Fraksinasi menggunakan metode ECC (Ekstraksi Cair-cair) dengan menggunakan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan air. Dari hasil fraksi *n*-heksan diperoleh berat sebesar 0,092 gram, dengan hasil rendemen 0,184%, berat fraksi etil asetat sebesar 17,1 gram dengan hasil

rendemen 11,4%, dan untuk fraksi air diperoleh berat 20,81 gram dengan hasil rendemen 13,8%.

Dilakukan pengujian sitotoksitas pada sel kanker DU 145 dari fraksi air, *n*-heksan, etil asetat dan ekstrak etanol daun pepaya (*Carica papaya* L.). Metode yang digunakan pada pengujian ini adalah metode MTT *assay*. MTT *assay* ini merupakan salah satu pengujian secara *in vitro*. Penelitian sitotoksitas yang dilakukan secara *in vitro* adalah Langkah pertama dalam proses berkembangnya obat antikanker yang berasal dari tanaman untuk menentukan senyawa aktif.

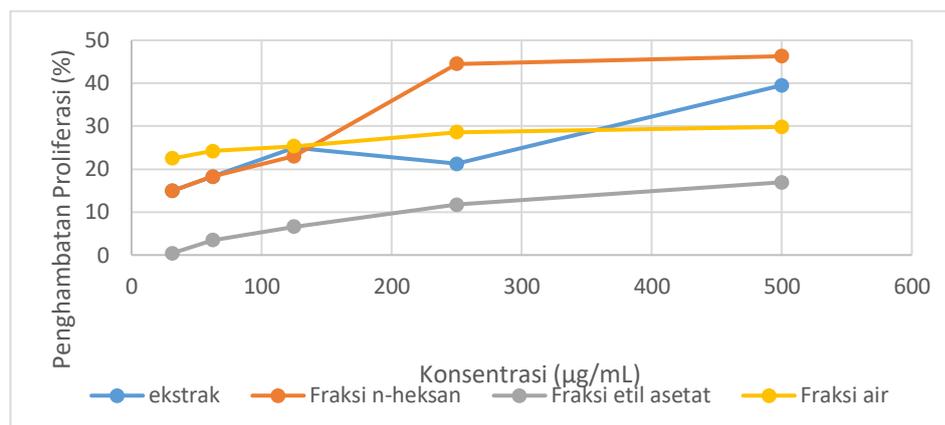
Pengujian sitotoksitas dapat dilakukan dengan mengamati sel yang bertahan hidup setelah dilakukan pemberian sampel uji yang diduga memiliki aktivitas sitotoksik. Metode MTT *assay* merupakan metode yang digunakan dalam pengujian sitotoksitas dalam penelitian ini. Pengamatan sel yang bertahan hidup setelah pemberian sampel dapat dilakukan dengan melihat nilai absorbansi yang diperoleh menggunakan *elisa reader*. Sel-sel yang hidup setelah pemberian sampel dapat terdeteksi dari perubahan warna akibat pemberian reagen MTT. Prinsip utama MTT *assay* adalah dimana dehidrogenase mitokondria dalam sitokrom dari sel-sel yang hidup dapat membelah cincin tetrazol, dan MTT berwarna kuning direduksi sehingga menghasilkan kristal formazan ungu. Zat ini larut dalam dimetil sulfoksida dan pelarut organik lainnya. Jumlah kristal yang terbentuk memiliki korelasi positif terhadap jumlah dan aktivitas dari sel tersebut, dan dengan mengukur nilai absorbansi menggambarkan jumlah sel hidup dan aktivitas dari sel tersebut.

Sebelum dilakukan pengujian sitotoksitas, sampel yang akan digunakan dipersiapkan terlebih dahulu. Ekstrak etanol, fraksi air, dan juga fraksi etil asetat dibuatkan stok dalam konsentrasi 40000 µg/mL yang dilarutkan dengan 1 mL penggunaan DMSO, sedangkan untuk fraksi *n*-heksan dibuatkan stok dalam 10000 µg/mL dalam 1 mL penggunaan DMSO. Dilarutkan dalam DMSO karena tidak seluruh sampel dapat larut dalam medium, maka dari itu untuk melarutkannya ditambahkan terlebih dahulu DMSO ke dalam sampel DMSO. Karena DMSO adalah pelarut organik universal namun memiliki efek sitotoksik pada kadar tertentu untuk penggunaan DMSO harus diperhatikan. Setelah dibuat larutan stock dengan konsentrasi 40000 µg/mL, dilakukan pengenceran bertingkat sehingga diperoleh konsentrasi pengujian 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; dan 31,25 µg/mL. Setiap kolom masing-masing diisi dengan kontrol DMSO, pembanding doxorubicin, sampel ekstrak etanol, fraksi air, fraksi etil asetat, fraksi *n*-heksan. Kemudian *well plate* diinkubasi 24 jam. Setelah diinkubasi ditambahkan reagen MTT. *Well plate* kemudian diinkubasikan kembali selama 2-4 jam. Setelah 4 jam kristal formazan yang terbentuk dicuci dengan *detergent reagen* dan dilakukan penghitungan jumlah sel menggunakan *elisa reader*. Hasil absorbansi kemudian dihitung dalam presentase penghambatan proliferasi sel seperti terdapat pada [Tabel III](#).

Tabel III. Persen Penghambatan Proliferasi Sel DU 145 oleh, Fraksi Air, *n*-Heksan, Etil Asetat dan Ekstrak Etanol Daun Pepaya

Konsentrasi (µg/mL)	Penghambatan Proliferasi (%)			
	Ekstrak	Fraksi <i>n</i> - heksan	Fraksi Etil Asetat	Fraksi Air
500	39,52	46,92	16,94	29,84
250	21,23	44,48	11,73	28,60
125	25,04	23,02	6,60	25,31
62,5	18,29	3,30	3,48	24,25
31,25	14,92	-0,43	0,43	22,47

Berdasarkan data diatas dapat dilakukan perhitungan *Inhibition Concentration* 50 (IC₅₀) dan hasilnya dapat dilihat pada [Tabel IV](#) :



Gambar 1. Perbandingan Presentase Penghambatan Proliferasi Pada Ekstrak etanol, Fraksi *n*-Heksan, Fraksi Etil Asetat, dan Fraksi air, Daun Pepaya (*Carica papaya L.*) terhadap sel DU 145

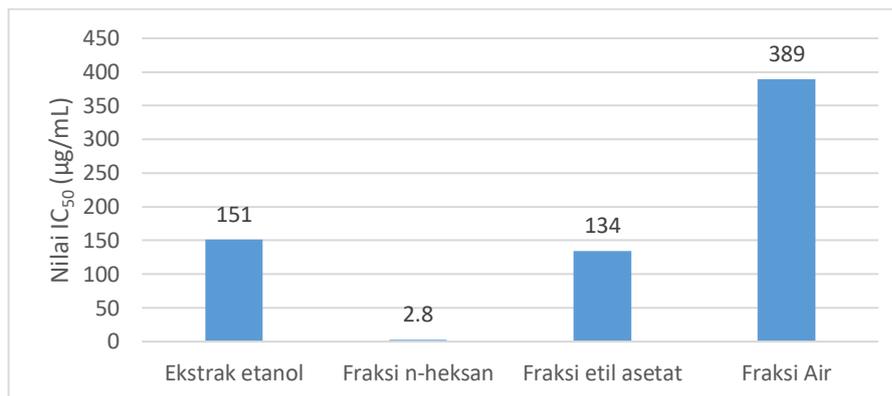
Berdasarkan data pada Tabel III dan Gambar 1. fraksi *n*-heksan mempunyai daya hambat terhadap sel kanker prostat DU 145 dengan kategori sangat aktif.

Tabel IV. Nilai IC₅₀, Fraksi Air, Etil Asetat, *n*-heksan dan Ekstrak Etanol Daun Pepaya (*Carica papaya L.*) terhadap sel DU 145

Sampel	Nilai IC ₅₀ (µg/mL)
Fraksi <i>n</i> -heksan	2,80
Fraksi etil asetat	134
Ekstrak etanol	151
Fraksi Air	398

Perhitungan IC₅₀ dari persamaan regresi linier yang diambil dari dua titik yang mengapit nilai persen toksisitas 50% sehingga diperoleh grafik dengan persamaan garis yang dapat digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ menunjukkan konsentrasi konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan sel sebesar 50% dari total populasinya. Nilai IC₅₀ yang lebih kecil menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki sifat yang lebih toksik dibandingkan dengan nilai IC₅₀ yang lebih besar. Nilai IC₅₀ terbagi menjadi beberapa kategori : sangat aktif (≤ 10 µg/mL), aktif (10-100 µg/mL), cukup aktif (100-500 µg/mL), dan tidak aktif (> 500 µg/mL) (Yogiraj *et al.*, 2015).

Berdasarkan hasil yang tertera pada Tabel IV menunjukkan bahwa fraksi *n*-heksan daun pepaya memiliki aktivitas sitotoksik yang sangat aktif dengan nilai IC₅₀ sebesar 2,80 µg/mL. Hasil aktivitas sitotoksik tersebut dibuktikan dari hasil penafisan fitokimia dari daun pepaya. Metabolit sekunder yang bersifat nonpolar seperti alkaloid pada penafisan fitokimia memperoleh hasil positif. Hal ini membuktikan bahwa alkaloid (*carpaine*) berkhasiat melawan kanker dengan cara menghambat EGFR^{wt} kinase dan aromatase (CYP19A) (Hamed *et al.*, 2022). Sedangkan pada fraksi air dengan nilai IC₅₀ sebesar 398 µg/mL, fraksi etil asetat sebesar 134 µg/mL dan ekstrak etanol daun pepaya memiliki nilai IC₅₀ sebesar 151 µg/mL bersifat cukup aktif terhadap sel DU 145.



Gambar 2. Perbandingan nilai IC₅₀ Ekstrak etanol, Fraksi *n*-heksan, Fraksi Etil Asetat, dan Fraksi Air Daun Pepaya (*Carica papaya L.*) terhadap sel DU 145.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian sitotoksisitas fraksi dan ekstrak daun pepaya (*Carica papaya L.*) menggunakan MTT *assay method* yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa fraksi *n*-heksan daun pepaya (*Carica papaya L.*) memiliki IC₅₀ sebesar 2,8 µg/mL memiliki aktivitas sitotoksik sangat aktif. Fraksi air, etil asetat, dan ekstrak etanol daun pepaya (*Carica papaya L.*) memiliki IC₅₀ masing-masing 398 µg/mL, 134 µg/mL, dan 151 µg/mL dinyatakan memiliki aktivitas sitotoksik cukup aktif terhadap sel kanker prostat DU 145.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada LP4M Universitas Garut dan STIKes Karsa Husada Garut yang telah memberikan dana hibah penelitian hingga terselesaikannya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2009. Prosedur Tetap: Persiapan Kerja in vitro di laboratorium. Cancer Chemoprevention Research Center Farmasi UGM Yogyakarta, 1–6.
- Beheshti, M., Schöder, H., Walz, J., Rezaee, A., & Langsteger, W. 2018. Chapter 10 - Prostate Cancer (M. Beheshti, W. Langsteger, & A. B. T.-P. in C. A. I. A. to I. I. Rezaee (eds.); pp. 199–219). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48567-8.00010-9>
- Fauci, J. M., Whitworth, J. M., Schneider, K. E., Subramaniam, A., Zhang, B., Frederick, P. J., Kilgore, L. C., & Straughn, J. M. 2011. Prognostic significance of the relative dose intensity of chemotherapy in primary treatment of epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 122(3), 532–535. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.05.023>
- Fitria, N.A., Sidi, N.C., Safitri, R.K., Hasanah, A.D., Risni, T. 2013. Tempe Daun Pepaya Sebagai Alternatif Terapi Untuk Penderita Kanker. *Jurnal Teknosains Pangan* Vol 2 No 2 April 2013, 2(4), 41–48.
- Greenwell, M., & Rahman, P. K. S. M. 2015. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(10), 4103–4112. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(10\).4103-12](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(10).4103-12)
- Hamed, A. N. E., Abouelela, M. E., El Zowalaty, A. E., Badr, M. M., & Abdelkader, M. S. A. 2022. Chemical constituents from *Carica papaya* Linn. leaves as potential cytotoxic, EGFR wt and aromatase (CYP19A) inhibitors; a study supported by molecular docking', *RSC Advances*, 12(15), pp. 9154–9162. <https://doi.org/10.1039/D1RA07000B>.
- Hariyanti, S. 2018. Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun Pepaya (*Carica papaya*) Terhadap Sel MCF-7 dan Sel T47D. Thesis.
- Kementrian Kesehatan RI. 2015. Situasi Penyakit Kanker Indonesia. Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI, 2, 31–33.

- Nurul, Sujana, D., Nugraha, Y.R., Farhan, Z., & Hasyim, D. (2022). Studi *In Vivo*: Efek Analgesik Ekstrak dan Fraksi Air Akar Pakis Tangkur (*Polypodium feei* METT). *J Pharmacopolium*, 4(3), 242–249. <http://dx.doi.org/10.36465/jop.v4i3.791>
- Sujana, D., Suwandi, D. W., Rusdiana, T., Subarnas, A. 2020. Acute Toxicity Test Of Ethanol Extract Of Pakis Tangkur (*Polypodium Feei* MEET) Root From Talaga Bodas Mountain On Swiss Webster Mice. *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari*, 1(2), 167–179. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.52434/jfb.v1i2.856>
- Umbas, R., Hardjowijoto, S., Mochtar, C.A., Safriadi, F., Soesanto, W.D., Soedarso, M.A. 2017. Panduan Nasional Pelayanan Kedokteran Kanker Prostat. Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 8(9), 1–58.
- Weerapreeyakul, N., Nonpunya, A., Barusrux, S., Thitimetharoch, T., & Sripanidkulchai, B. 2012. Evaluation of the anticancer potential of six herbs against a hepatoma cell line. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, 7(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1749-8546-7-15>
- Yogiraj, V., Goyal, P. K., & Chauhan, C. S. 2014. Carica papaya Linn : An Overview. *International Journal of Herbal Medicine*, 2(5), 1–8.
- Zeng, H., Taussig, D. P., Cheng, W. H., Johnson, L. A. K., & Hakkak, R. 2017. Butyrate inhibits cancerous HCT116 colon cell proliferation but to a lesser extent in noncancerous NCM460 colon cells. *Nutrients*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/nu9010025>