

Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.) pada Sel Kanker Payudara dan Serviks Secara In Silico dan In Vitro

Aguslina Kirtishanti¹, Dini Kesuma², Fadita Trisa C¹ dan Maria Claudia Dwiyantri Tuga¹

¹Departemen Farmasi Klinis dan Komunitas, Fakultas Farmasi, Universitas Surabaya, Surabaya, Indonesia

²Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Surabaya, Surabaya, Indonesia

Korespondensi: Aguslina Kirtishanti
Email: aguslina@staff.ubaya.ac.id

Submitted: 25-11-2022, Revised: 22-12-2022, Accepted: 24-12-2022

ABSTRAK: Kanker payudara dan serviks merupakan kanker dengan jumlah terbanyak di Indonesia. Kemoterapi sebagai terapi kanker memiliki banyak efek samping, oleh karena itu diperlukan pengembangan obat antikanker terutama dari bahan alam yang efektif dan memiliki efek samping minimal. Salah satu bahan alam yang diprediksi mempunyai aktivitas antikanker adalah biji alpukat (*Persea americana* Mill.). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas sitotoksik ekstrak etanol biji alpukat pada sel kanker payudara dan serviks secara *in silico* dan *in vitro*. Senyawa aktif dalam biji alpukat di *docking* dengan reseptor estrogen (PDB code: 3ERT) and reseptor SIRT1 (PDB code: 4I5I) menggunakan program *Molegro Virtual Docker* 5.5 (MVD). Aktivitas sitotoksik secara *in vitro* dilakukan menggunakan metode *Microculture Tetrazolium Technique* (MTT) pada sel kanker payudara (MCF7), sel kanker serviks (HeLa) dan sel normal (Vero). Biji alpukat berisi 10 senyawa aktif yang diprediksi mempunyai aktivitas sitotoksik. Hasil uji *in silico* menunjukkan bahwa *epicatechin gallate* mempunyai nilai *rerank score* paling rendah yaitu -118,397 kkal/mol pada reseptor estrogen dan -133,694 kkal/mol pada reseptor SIRT1. Aktivitas sitotoksik secara *in vitro* ditunjukkan dengan nilai IC_{50} sebesar 537,37 $\mu\text{g/mL}$ (MCF7), 383,21 $\mu\text{g/mL}$ (HeLa) dan 541,67 $\mu\text{g/mL}$ (Vero). Dari hasil uji *in vitro* menyatakan bahwa ekstrak etanol biji alpukat tidak memiliki aktivitas sitotoksik pada sel kanker MCF7 dan memiliki aktivitas sitotoksik lemah pada sel HeLa.

Kata kunci: biji alpukat; *in silico*; *in vitro*; kanker payudara; kanker serviks

ABSTRACT: Breast and cervical cancer are cancers with the highest number in Indonesia. Chemotherapy, as one of the mainstay treatments of cancer, can cause harmful side effects; and, therefore, it is necessary to develop anticancer drug from natural ingredients with good efficacy and minimal side effects. One of the natural ingredients that is predicted to have anticancer activity is avocado seed (*Persea americana* Mill.). This study aimed to evaluate the *in-vitro* and *in-silico* cytotoxic activity of avocado seed extract on breast and cervical cancer cells. The active compounds in avocado seeds were docked with estrogen receptors (PDB code: 3ERT) and SIRT1 receptors (PDB code: 4I5I) using the MVD program. Cytotoxic activity *in vitro* was carried out using the MTT method on breast cancer cells (MCF7), cervical cancer cells (HeLa) and normal cells (Vero). Avocado seed contains 10 active compounds which are predicted to have cytotoxic activity. The findings from *in-silico* test showed that the "epicatechin gallate" had the lowest rerank score, i.e. -118.397 kcal/mol for the estrogen receptor and -133.694 kcal/mol for the SIRT1 receptor. Cytotoxic activity *in vitro* was shown by IC_{50} values of 537.37 $\mu\text{g/mL}$ (MCF7), 383.21 $\mu\text{g/mL}$ (HeLa) and 541.67 $\mu\text{g/mL}$ (Vero), respectively. The findings from *in-vitro* test showed that the avocado seed extract did not have cytotoxic activity on MCF7 cells and had weak cytotoxic activity on HeLa cells.

Keywords: avocado seed; *in silico*; *in vitro*; breast cancer; cervical cancer

1. Pendahuluan

Kanker adalah salah satu masalah kesehatan utama di dunia yang perlu mendapatkan perhatian khusus. Kasus kanker payudara dan kanker serviks merupakan kasus kanker tertinggi di Indonesia untuk semua penduduk dan jenis kelamin pada tahun 2020 [1]. Penatalaksanaan terapi kanker payudara dan serviks dapat berupa pembedahan, radioterapi dan kemoterapi. Penggunaan kemoterapi sering menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan dan terbatas pada jenis pilihan kemoterapinya [2]. Oleh karena itu diperlukan pengembangan obat kemoterapi, baik obat sintetis maupun obat herbal, dengan aktivitas antikanker yang tinggi dan efek samping minimal.

Penggunaan tanaman tradisional sebagai pengobatan semakin banyak digemari oleh masyarakat di masa kini karena memiliki banyak keuntungan antara lain mudah diperoleh, harga relatif murah dan dianggap memiliki efek samping yang lebih kecil daripada obat sintetis [3]. Bahan alam yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker adalah biji alpukat (*Persea americana* Mill.). Astuti *et.al* melakukan penelitian terhadap ekstrak metanol biji alpukat pada sel kanker kolon (WiDr) dan hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak metanol biji alpukat mempunyai kemampuan menginduksi apoptosis [4]. Penelitian lain mengenai biji alpukat pada sel kanker liver (HepG2) dan sel kanker kolon (HCT116) menunjukkan bahwa biji alpukat memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai IC_{50} berturut-turut sebesar 13,3 $\mu\text{g/mL}$ dan 3 $\mu\text{g/mL}$ [5].

Dalam biji alpukat mengandung 70 senyawa antara lain senyawa glikosida terpenoid, asam fenolik, flavonoid, alkaloid, asam lemak, sterol, dan hidrokarbon [5-7]. Melalui program PASS *Online*, ditemukan 10 senyawa dalam biji alpukat yang diprediksi memiliki aktivitas antikanker payudara dan serviks [8]. Selanjutnya 10 senyawa tersebut diproses *docking* secara *in silico* menggunakan program *Molegro Virtual Docker* 5.5 (MVD). Dalam pemodelan molekul, *docking* adalah metode untuk memprediksi afinitas ika-

tan antara ligan dan makromolekul seperti protein, lipid, karbohidrat dan asam nukleat yang berperan penting dalam transduksi sinyal [9]. Sepuluh senyawa dalam biji alpukat diproses *docking* dengan reseptor estrogen (PDB code: 3ERT) dan reseptor SIRT1 (PDB code: 4I5I). Aktivitas ditunjukkan dengan harga energi ikatan senyawa dengan reseptor, yang dinyatakan dalam nilai *Rerank Score* (RS). Makin kecil harga energi ikatan menunjukkan ikatan yang dihasilkan makin stabil, sehingga diprediksi aktivitasnya semakin besar [10].

Aktivitas sitotoksik *in vitro* dari ekstrak biji alpukat dilakukan menggunakan metode *Microculture Tetrazolium Technique* (MTT) pada sel kanker payudara (MCF7), sel kanker serviks (HeLa) dan sel normal (Vero) [11,12]. Metode MTT didasarkan pada reaksi reduksi metabolik 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide oleh enzim dehidrogenase mitokondria menjadi kristal formazan yang tidak larut air, yang berkorelasi langsung terhadap viabilitas sel [13,14]. Penelitian ini berkontribusi dalam memberikan alternatif kandidat antikanker payudara dan serviks dari bahan alam yang potensial pada sel kanker tersebut.

2. Bahan dan metode

2.1. Bahan

Bahan yang diperlukan untuk ekstraksi adalah etanol p.a (Merck). Bahan yang diperlukan untuk uji aktivitas sitotoksik secara *in vitro* adalah sel kanker payudara (MCF7), sel kanker serviks (HeLa), dan sel normal (Vero) dari laboratorium parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada, media kultur (DMEM dan RPMI)(Gibco, USA), Phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco, USA), tripsin (Gibco, USA), Penicillin-Streptomycin (Gibco, USA), fungizone (Gibco, USA), fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA), DMSO (Merck), 0.5 mg/mL 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and 10% SDS-0.01M HCl (Merck).

2.2. Alat

Program *ChemBioDraw Ultra* 15.0 (CambridgeSoft, software lisensi), dan *Molegro Virtual Docker* (MVD) ver. 5.5 yang digunakan untuk pemodelan molekul. Alat yang digunakan untuk uji aktivitas sitotoksik secara *in vitro* adalah inkubator CO₂ (Memmert), *laminar air flow* (LAF) cabinet (Thermo Fisher), *blue* dan *yellow micropipette* (A-Gen biotechnology), *test tube* (A-Gen biotechnology), *vortex* (HST 250 VM Hwasin), *96-well microplates* (A-Gen biotechnology), *conical tube* (A-Gen biotechnology), *inverted microscope* (Olympus), *hemocytometer* dan *microplate reader*.

2.3. Pemodelan molekul

Biji alpukat diketahui mengandung 70 senyawa, dan melalui program *PASS online* diperoleh 10 senyawa yang diprediksi memiliki aktivitas antikanker. Selanjutnya senyawa tersebut di *docking* menggunakan reseptor estrogen (PDB code: 3ERT) dengan ligan pembandingnya 4-hydroxytamoxifen dan reseptor SIRT1 (PDB code: 4I5I) dengan ligan pembandingnya (6*S*)-2-chloro-5,6,7,8,9,10-hexahydrocyclohepta[b]indole-6-carboxamide menggunakan program MVD ver.5.5. Validasi proses docking pada reseptor estrogen menunjukkan nilai RMSD = 1.39 pada *cavity* 1 dan reseptor SIRT1 menunjukkan nilai RMSD = 0.24 pada *cavity* 2.

2.4. Ekstraksi biji alpukat

Biji alpukat yang sudah dihaluskan lalu dimasukkan kedalam wadah gelas, dan kemudian ditambah etanol p.a 96% sampai seluruh simplisia terendam. Proses ini dilanjutkan dengan pendiaman selama 3-5 hari. Simplisia kemudian disaring untuk mendapatkan filtratnya. Filtrat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* kemudian dilanjutkan diatas penangas air sampai didapat ekstrak kental dengan bobot konstan.

2.5. Aktivitas sitotoksik secara *in vitro*

Kultur sel MCF7, HeLa dan sel Vero ditanam pada 96 sumuran dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada kondisi 37°C, 1 atm selama 24 jam. Setelah itu ke dalam sumuran ditambahkan

ekstrak etanol biji alpukat dengan konsentrasi 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 dan 15,625 µg/mL. Setiap konsentrasi direplikasi sebanyak 3 kali, lalu diinkubasi lagi selama 24 jam. Selanjutnya setiap sumuran ditambah 100 µL reagen MTT 0,5 mg/mL diikuti inkubasi selama 4 jam. Setelah 4 jam dilakukan penambahan 100 µL larutan 10% SDS 0,01N HCl ke dalam setiap sumuran untuk melarutkan kristal formazan. *Microplate* dibungkus kertas dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Absorbansi kemudian dibaca menggunakan *microplate reader* pada $\lambda = 595$ nm [11,15-17]. Dari hasil pembacaan absorbansi lalu dihitung fraksi sel hidup, kemudian dianalisis menggunakan analisis probit SPSS versi 25.0 untuk mendapatkan nilai IC₅₀ dari ekstrak etanol biji alpukat.

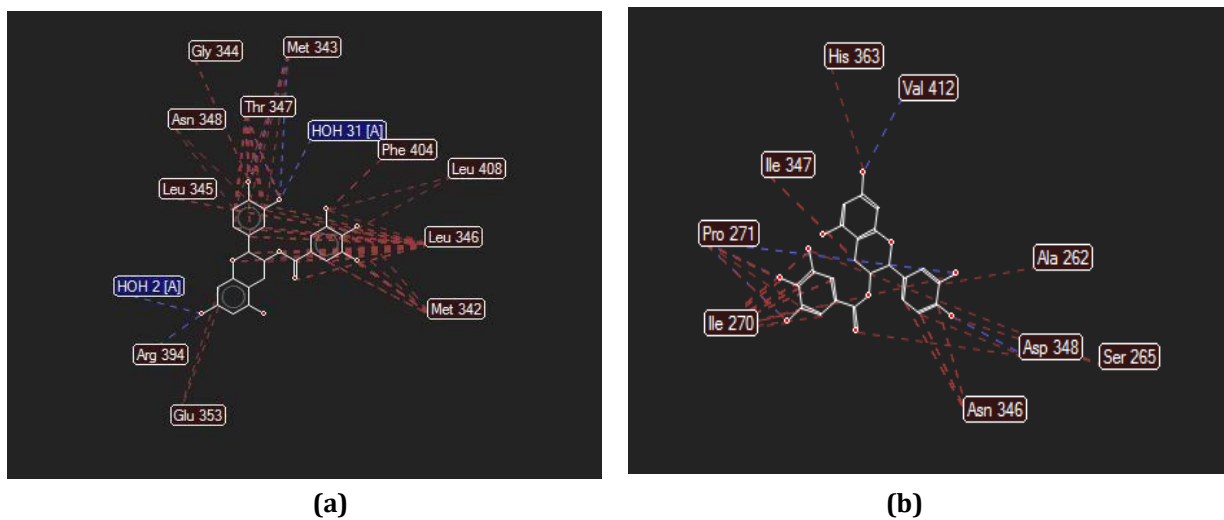
3. Hasil dan pembahasan

Aktivitas sitotoksik ekstrak etanol biji alpukat diprediksi menggunakan pemodelan molekul *in silico* dan memberikan hasil berupa nilai *rank score* (RS). Senyawa yang mempunyai nilai RS kecil diprediksi mempunyai aktivitas sitotoksik yang besar, dan demikian sebaliknya [18,19]. Nilai RS dari senyawa-senyawa yang terkandung dalam biji alpukat (10 senyawa) ditunjukkan pada Tabel 1. Interaksi senyawa dalam biji alpukat pada sisi aktif reseptor estrogen dan SIRT1 ditunjukkan pada Tabel 2. Gambar 1 menunjukkan interaksi senyawa pada sisi aktif reseptor estrogen dan SIRT1 yang memiliki RS paling rendah, yaitu *epicathecin gallate*.

Aktivitas sitotoksik *in vitro* dari ekstrak etanol biji alpukat dilakukan pada sel MCF7, HeLa dan sel Vero. Tabel 3 menunjukkan nilai IC₅₀ ekstrak etanol biji alpukat. Berdasarkan Tabel 1, senyawa dalam biji alpukat yang mempunyai nilai RS paling rendah adalah *epicathecin gallate*, sehingga diprediksi bahwa aktivitas sitotoksik senyawa tersebut paling besar dalam biji alpukat terhadap sel kanker. Hal ini juga didukung oleh interaksi senyawa *epicathecin gallate* dengan asam amino pada sisi aktif dari reseptor estrogen dan SIRT1

Tabel 1. Rerank score (RS) dari senyawa aktif dalam biji alpukat pada reseptor estrogen dan reseptor SIRT1

Senyawa	Rerank Score (kkal/mol) pada Reseptor Estrogen	Rerank Score (kkal/mol) pada Reseptor SIRT1
4-hydroxytamoxifen (Ligan original) pada reseptor estrogen	-129,74	-
(6S)-2-chloro-5,6,7,8,9,10-hexahydrocyclohepta[b]indole-6-carboxamide (Ligan original) pada reseptor SIRT1	-	-95,57
Quercetin	-87,35	-102,28
Epicathecin gallate	-118,40	-133,69
(2R, 16E)-1-asetoksi-2- hidroksi-4-okso- nonadeka-16,18-dien	-106,94	-129,03
Stigmasterol	-77,72	-93,79
Epicathecin	-82,87	-81,78
Catechin	-81,23	-84,48
Quinic acid	-78,55	-73,84
Procyanidin trimer A(1)	-92,62	-57,40
Procyanidin trimer A(II)	-86,49	-58,17
3-O-coumorylquinic acid	-102,85	-108,83



Gambar 1. Interaksi senyawa *epicatechin gallate* dengan asam amino pada sisi aktif reseptor estrogen (a) dan reseptor SIRT1 (b)

menunjukkan jumlah ikatan hidrogen yang lebih banyak dibandingkan dengan senyawa yang lain dan juga memiliki interaksi sterik (Tabel 2). *Epicathecin gallate* adalah kelompok polifenol yang banyak ditemukan dalam tanaman, termasuk biji alpukat. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Baik and Lee (2009), *epicatechin gallate* menunjukkan aktivitas biologis yang kuat dalam beberapa aspek, antara lain menginduksi apoptosis dan menghambat pertumbuhan dalam sel kanker ko-lorektal [20]. Hal ini memperkuat ala-

san bahwa biji alpukat yang mengandung *epicatechin gallate* dapat dilanjutkan untuk pengujian aktivitas sitotoksik secara *in vitro*.

Aktivitas sitotoksik secara *in vitro* dari ekstrak biji alpukat pada sel MCF7 menunjukkan bahwa ekstrak tersebut tidak memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai IC_{50} sebesar 541,67 $\mu\text{g/mL}$ dan memiliki aktivitas sitotoksik yang lemah pada sel HeLa dengan IC_{50} sebesar 383,21 $\mu\text{g/mL}$. Berdasarkan *U.S. National Cancer Institute* (NCI) dan protokol Geran bahwa nilai $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$

Tabel 2. Interaksi senyawa dalam biji alpukat pada sisi aktif reseptor estrogen dan SIRT1

Senyawa	Interaksi Ligan dengan asam amino pada Reseptor Estrogen		Interaksi Ligan dengan asam amino pada Reseptor SIRT1	
	Ikatan Hidrogen	Interaksi Sterik	Ikatan Hidrogen	Interaksi Sterik
4-hydroxytamoxifen (Ligan original) pada reseptor estrogen	Arg394(1), Glu353(1),	Glu353(2)	-	-
(6S)-2-chloro-5,6,7,8,9,10-hexahydrocyclohepta[b]indole-6-carboxamide (Ligan original) pada reseptor SIRT1	-	-	Gln345(1)	Ile316(1), Ile347(1), Phe273(1),
Quercetin	Arg394(2)	Glu353(2), Ile424(3)	Gln345(1), His363(2)	Gln345(4), His363(6), Ile316(1)
Epicatechin gallate	Arg394(1), Arg352(1), Ala350(1), Glu353(1)	Arg394(1), Arg352(7), Ala350(2), Glu353(7)	Phe413(1), His363(1), Val412(4)	Gln345(3), Ile411(3), Ile270(1), Phe413(4), Val412(9), His363(7),
(2R, 16E)-1-asetoksi-2-hidroksi-4-okso-nonadeka-16,18-dien	Arg394(1), Glu353(1)	Asn407(5), Ala405(3), Glu353(3)	Gln345(1)	Gln345(7), Gln320(5), Asp348(2), Asn346(2), Gly261(1), His363(1), Ile270(3), Ile347(1), Phe321(7), Thr260(4), Thr344(1)
Stigmasterol	Arg394(1), Glu353(1)	Glu353(1), Glu419(5), Gly420(3), Gly415(1), His524(1)		Ile279(3), Ile316(6), Leu283(4), Leu290(1), Met296(4), Phe273(3), Phe287(6), Phe297(7), Phe312(9)
Epicatechin	Arg394(1),	Glu353(2), Ala350(3)	Asp348(1), Pro271(1), Val412(1)	Asp348(1), Asn346(3), Ile270(1), Ile347(2), Ser265(1)
Catechin	Arg394(1),	Glu353(2), Glu385(4)	Asp348(1), Ala262(1), Pro271(1), Ser265(1), Val412(1)	Asp348(1), Asn346(3), Ile270(1), Ile347(2), Ser265(1)
Quinic acid	Ala350(1)	Ala350(5), Glu353(7),	Gln345(1), Ile347(1)	Asn346(1), Ile279(1), Phe273(6)
Procyanidin trimer A(I)	Arg394(1), Ala350(1), Glu353(1), Gly521(1), His524(2)	Glu353(2), Glu419(1), Gly420(2), Gly521(2), His524(6)	Ala262(1), Asn346(1), Cys362(2), Gln345(1), Gln361(2), Gly364(2), His363(4), Ser365(1), Val412(2)	Ala262(4), Asn346(8), Cys362(9), Gln345(8), Gly364(12), Ile270(1), Ile347(4), Leu259(1), Leu418(19), Phe273(3), Phe422(2), Ser365(2), Thr 344 (2), Tyr 343(5), Val412(1)
Procyanidin trimer A(II)	Arg394(1), Glu353(1), Glu419(3),	Ala350(1), Glu353(2), His524(6), Gly420(3), Glu419(2),	Ala262(1), Arg274(1), Asn346(1), Gly261(1), His327(1), His363(1), Ile316(1), Ile347(1), Met296(2), Phe273(1), Phe297(1), Pro271(1), Ser265(1), Thr260(1), Thr344(1), Val412(1)	Ala262(12), Asn346(11), Asp272(3), Gln345(3), Gly261(7), His327(1), His363(5), Ile316(12), Ile347(10), Ile411(1), Phe273(3), Phe297(6), Phe366(6), Phe309(4), Phe413(3), Ser265(3), Thr260(1), Val264(4)
3-O-coumorylquinic acid	Arg394(1), Glu353(1), Gly420(1)	Glu353(2), Gly521(2), Ile424(5)	Asn346(1), Pro271(1)	Asn346(1), Gln345(1), Ile316(2), Ile347(2), Ile411(2), Phe297(6), Phe309(1), Phe413(2),

Tabel 3. Nilai IC₅₀ ekstrak etanol biji alpukat pada sel MCF7, HeLa dan Vero

Bahan Uji	Sel Kultur	IC ₅₀ (µg/mL)
Ekstrak Etanol Biji Alpukat	MCF7	541,67
	HeLa	383,21
	Vero	564,45

menunjukkan aktivitas sitotoksik tinggi, IC₅₀ antara 21 – 200 µg/mL memiliki aktivitas sitotoksik sedang, IC₅₀ antara 201 – 500 µg/mL memiliki aktivitas sitotoksik lemah, dan IC₅₀ >501 µg/mL tidak memiliki aktivitas sitotoksik [21-24].

Jika dilihat dari hasil uji *in silico* pada reseptor estrogen, senyawa-senyawa aktif dalam biji alpukat memiliki RS yang lebih besar dibandingkan dengan ligan pembanding yaitu 4-hidroksi tamoxifen. Hal ini menyatakan bahwa senyawa aktif dalam biji alpukat diprediksi memiliki aktivitas sitotoksik yang rendah dibandingkan 4-hidroksi tamoxifen. Hasil tersebut tergambar pula pada hasil uji *in vitro*, yang membuktikan bahwa ekstrak biji alpukat tidak memiliki aktivitas sitotoksik. Sementara itu, hasil uji *in silico* pada reseptor SIRT1 menunjukkan ada 4 senyawa aktif dalam biji alpukat yang memiliki RS lebih kecil dari ligan pembanding, yaitu carboxamide. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa aktif tersebut diprediksi memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih besar dibandingkan ligan pembanding. Hasil uji *in silico* juga tergambar pada hasil uji *in vitro*, yang menyatakan bahwa ekstrak etanol biji alpukat memiliki aktivitas sitotoksik, walaupun sifatnya lemah. Hal ini juga dapat disebabkan 4 senyawa aktif dalam ekstrak etanol biji alpukat tersebut tersari dengan prosentase kecil. Tempat tumbuh dan waktu panen akan mempengaruhi pula konsentrasi senyawa aktif dalam suatu tanaman.

4. Kesimpulan

Aktivitas sitotoksik secara *in silico* menunjukkan bahwa senyawa *epicatechin gallate* memiliki aktivitas sitotoksik paling besar dibandingkan senyawa lain dalam biji alpukat. Ekstrak etanol biji

alpukat tidak memiliki aktivitas sitotoksik pada sel kanker MCF7 dan memiliki aktivitas sitotoksik lemah pada sel HeLa.

Daftar pustaka

1. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Available from: <https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf>.
2. Dange VN, Shid SJ, Magdum CS, Mohite SK. A Review on breast cancer: An overview. *Asian Journal of Pharmaceutical Research*. 2017;7(1):49-51.
3. Suryati S, Dwisari D, Fridhani R. Pengaruh ekstrak etanol daun *Vernonia amygdalina*. Del terhadap kadar kreatinin serum mencit putih jantan. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*. 2016;3(1):79-83.
4. Astuti NMW, Laksmiani NPL, Wirasuta IMAG. Aktivitas induksi apoptosis ekstrak metanol biji alpukat pada sel WiDR secara flowcytometry. *Prosiding Senastek*. 2017;17-21.
5. Alkhalf MI, Alansari WS, Ibrahim EA, Elhalwagy MEA. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activities of avocado (*Persea americana*) fruit and seed extract. *Journal of King Saud University - Science*. 2019;13:1358-1362.
6. Noorul H, Mujahid M, Badruddeen, Khalid M, Vartika S, Nesar A, Zafar K, Zohrameena S. Physico-phytochemical analysis & estimation of total phenolic, flavonoids and proanthocyanidin content of *Persea americana* (avocado) seed extracts. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;5(4):70-77.
7. Retnosari R, Sutrisno, Handoyo K. Aktivitas antibakteri metabolit sekunder dari ekstrak metanol biji alpukat (*Persea americana* Mill). *JC-T (Journal Cis-Trans): Jurnal Kimia dan Terapannya*. 2017; 1(1):16-21.

8. Filimonov DA, Lagunin AA, Gloriovzova TA, Rudik AV, Druzhilovskii DS, Pogodin PV, Poroikov VV. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the pass online web resource. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2014;50(3): 444-457.
9. Sindhu TJ, Arathi KN, Akhila Devi, Aswathi TA, Noushida M, Midhun M, Kuttiyil SS. Synthesis, molecular docking and antibacterial studies of novelazole derivatives as *enoyl ACP reductase* inhibitor in *Escherichia coli*. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*. 2019; 9(3): 174-180.
10. Siswandono, Soekardjo B. Kimia Medisinal. Surabaya: Airlangga University Press; 2008.
11. Cancer Chemoprevention Research Center Faculty of Pharmacy UGM (CCRC- UGM). Fixed procedure Cytotoxic Test Method MTT. 2012.
12. Kangralkar VA, Kulkarni AR. In vitro cytotoxic activity of alcoholic extract of *Aristolochia indica*. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2013;6(11):1240-1241.
13. Radhika C, Venkatesham A, Venkateshwar RJ, Sarangapani M. Synthesis and cytotoxic activity of new indole derivatives. *Asian Journal of Research in Chemistry*. 2010;3(4):965-968.
14. Vajrabhaya L, Korsuwannawong S. Cytotoxicity evaluation of a Thai herb using tetrazolium (MTT) and sulforhodamine B (SRB) assays. *Journal of Analytical Science and Technology*. 2018;9(15).
15. Singh MK, Prathapan A, Nagori K, Ishwarya S, Raghu KG. Cytotoxic and antimicrobial activity of methanolic extract of *Boerhaavia diffusa* L. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2010;3(4):1061-1063.
16. Satria D, Silalahi J, Haro G, Ilyas S, Hasibuan PAZ. Chemical analysis and cytotoxic activity of n-hexane fraction of *Zanthoxylum acanthopodium* DC. fruits. *Rasāyan Journal of Chemistry*. 2019;12(2):803.
17. Venkataramireddy V, Shankaraiah M, Allaka TR, Kalyani C, Narasu ML, Varala R, Anireddy J. Synthesis and anti-cancer activity of novel 3-aryl thiophene-2-carbaldehydes and their aryl/heteroaryl chalcone derivatives. *Rasāyan Journal of Chemistry*. 2016;9(1):31-39.
18. Hinchliffe A. Molecular Modelling for Beginners, 2nd ed. Chichester: John Wiley and Sons Ltd; 2008.
19. Hardjono S, Widiandani T, Purwanto BT, Nasyanka AL. Molecular docking of *N*- benzoyl-*N'*-(4-fluorophenyl) thiourea derivatives as anticancer drug candidate and their ADMET prediction. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2019;12(5):2160-2166.
20. Baek SJ and Lee SH. Anti-cancer property of epicatechin gallate in colon cancer cells. *Beer in Health and Disease Prevention*, 2009;871-878.
21. Sajjadi SE, Ghanadian M, Haghghi M, Mouhebat L. Cytotoxic effect of *Cousinia verbascifolia* Bunge against OVCAR-3 and HT-29 cancer cells. *Journal of HerbMed Pharmacology*. 2015;4(1):15-19.
22. Srisawat T, Chumkaew P, Heed-Chim W, Sukpondma Y, Kanokwiroon K. Phytochemical screening and cytotoxicity of crude extracts of *Vatica dio-spyroides* Symington Type LS. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12:71-6.
23. Goldin A, Venditti JM, Macdonald JS, Muggia FM, Henney JE, Devita VT Jr. Current results of the screening program at the division of cancer treatment, National Cancer Institute. *European Journal of Cancer*. 1965;17:129-42.
24. Geran RI, Greenberg NH, MacDonald MM, Schumaker AM, Abbott BJ. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemother Rep*. 1972;3:59-61.