

Evaluation of Cytotoxicity Effect of *Hyptis pectinata* Poit (Lamiaceae) extracts using BSLT and MTT methods

Meiny Suzery^{1,*}, Bambang Cahyono¹

¹Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jl. Prof Soedarto SH, Kampus Tembalang, Semarang 50275 (Phone/Fax: 62-024-76480824).

*Corresponding author's email: meiny_suzery@undip.ac.id / meiny_suzery@yahoo.com

ABSTRACT

Hyptis pectinata (Lamiaceae) is a traditional medicinal plants to treat conditions associated with malignant disease. In Indonesia, this plant has not been utilized yet, just as a wild plant. This study aimed to evaluate the anticancer activity of *Hyptis pectinata* poit extracts which are more beneficial. Methanol extract and various fractions solvents (hexane, dichloromethane, ethyl acetate) were examined their toxicities to shrimp larvae *Artemia salina* Leach using BSLT method and their anticancer activity in vitro on cells MCF-7 breast cancer using MTT assay method. The toxicity test on shrimp larvae *Artemia salina* Leach, methanol extracts have LC₅₀: 185.63 µg/mL and fractions of hexane, dichloromethane and ethylacetate were obtained at 128.45; 113.32 and 92.54 µg/mL successively. Whereas the cytotoxicity test on breast cancer cells MCF-7 resulted that methanol extract *Hyptis pectinata* poit obtained at IC₅₀: 18.90 µg/mL. *Hyptis pectinata* poit extract showed good cytotoxic and anticancer activity hence it has a chance to be developed to as anticancer drugs.

Keywords: Hyptis pectinata poit, Artemia salina Leach, MCF-7 cancer cell lines, MTT assay

ABSTRAK

Hyptis pectinata (Lamiaceae) merupakan tanaman obat tradisional untuk mengobati kondisi yang berhubungan dengan penyakit keganasan. Di Indonesia, pemanfaatan tanaman ini belum banyak dilakukan, hanya sebagai tanaman liar. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas antikanker dari ekstrak *Hyptis pectinata* Poit sehingga lebih berdayaguna. Ekstrak metanol dan berbagai fraksi pelarut (heksan, diklorometana, etilasetat) diperiksa toksisitasnya dengan larva udang *Artemia salina* Leach menggunakan metoda BSLT dan aktivitas antikanker secara in-vitro pada sel kanker payudara MCF-7 menggunakan metoda MTT assay. Hasil uji toksisitas pada larva udang *Artemia salina* Leach, ekstrak metanol memiliki LC₅₀: 185,63 µg/mL dan fraksi pelarut heksan, diklorometana dan etilasetat berturut-turut diperoleh pada 128,45; 113,32 dan 92,54 µg/mL. Sedangkan hasil uji sitotoksitas pada sel kanker payudara MCF-7, ekstrak metanol *Hyptis pectinata* Poit diperoleh pada IC₅₀: 18,90 µg/mL. Ekstrak *Hyptis pectinata* Poit bersifat sebagai sitotoksik dan menunjukkan aktivitas antikanker yang baik, sehingga mempunyai peluang untuk dikembangkan untuk obat antikanker.

Kata kunci: Hyptis pectinata Poit, Artemia salina Leach, MCF-7 cell lines cancer, MTT assay

Pendahuluan

Usaha mencari obat alternatif untuk mengobati penyakit kanker sampai saat ini masih tetap dilakukan namun belum banyak ditemukan obat yang dapat mengatasi penyakit tersebut. Oleh karena itu, diperlukan eksplorasi dari bahan alam hayati, penemuan obat yang dapat menghambat atau

menyembuhkan penyakit kanker secara selektif, efektif, dan tidak menimbulkan efek samping.

Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) telah digunakan untuk bioassay umum yang mampu mendeteksi spektrum bioaktivitas dalam ekstrak suatu tanaman menggunakan *Artemia salina* Leach. Metode yang digunakan untuk skrining awal terhadap senyawa aktif antikanker terhadap uji toksisitas

menggunkan larva udang dari *Artemia salina* Leach. Metode ini dapat digunakan sebagai bioassay guided fractionation dari bahan alam karena mudah, cepat, dan murah serta dapat digunakan untuk memprediksi toksisitas dari sampel uji [1]

Beberapa senyawa bioaktif yang telah berhasil diisolasi dan dimonitor aktivitasnya dengan BSLT menunjukkan adanya korelasi terhadap suatu uji spesifik antitumor. Apabila senyawa tersebut dinyatakan bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* L., maka dapat dilakukan uji lanjutan antikanker terhadap sel kanker. Efek sitotoksik menggunakan sel kanker dievaluasi dengan menggunakan metode MTT assay. Uji sitotoksik untuk mengetahui potensi antikanker suatu ekstrak/senyawa yang dinyatakan dengan IC_{50} , yang merupakan konsentrasi larutan uji yang dapat mematikan 50% populasi sel [2]. Untuk menentukan nilai IC_{50} , hambatan pertumbuhan sel, sel yang hidup maupun yang mati dengan dasar pembentukan kristal formazan yang berwarna ungu [3]. Hambatan pertumbuhan sel terdeteksi dengan adanya absorbansi sel dalam bentuk warna. Intensitas warna ungu proporsional dengan jumlah sel yang hidup (membentuk kristal formazan), sedangkan sel yang mati akan memberikan warna kuning [4].

Berdasarkan sifat-sifat toksik yang dihasilkan dari suatu bahan bersifat antikanker maka dapat dijadikan untuk memprediksi keberadaan obat alam sebagai antikanker. Beberapa penelitian mulai diarahkan untuk mencari potensi bahan alam sebagai obat antikanker. Salah satunya adalah tumbuhan *Hyptis pectinata* Poit family dari Lamiaceae yang telah banyak digunakan sebagai obat tradisional khususnya di Brazil dan Meksiko. Di Brazil, tanaman ini sudah dibudidayakan, dikenal dengan nama "sambacaita" atau "canundiho" [5]. Efek farmakologi dari tanaman *Hyptis pectinata* Poit diketahui bersifat sitotoksik dan antimikroba [6], meningkatkan regenerasi liver [7, 8], antinociceptive dan antiedematogenik [9, 10], antitumor [5].

Senyawa bioaktif hampir selalu dilaporkan bersifat toksik pada dosis tinggi, namun seberapa jauh kemampuan aktivitasnya masih bervariasi satu sama lainnya. Oleh karena itu untuk menapis ekstrak tumbuhan yang mempunyai bioaktivitas dari fraksi bioaktif selama fraksinasi terhadap organisme hewan

sangat perlu dilakukan. Salah satu organisme yang sesuai untuk hewan uji adalah larva udang *Artemia salina* Leach. Dan untuk mengetahui efek antikanker dilakukan pada sel kanker payudara (cell line breast cancer MCF-7) dengan metoda MTT Assay [11]. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi sitotoksitas ekstrak metanol *Hyptis pectinata* Poit dan melakukan fraksinasi kedalam berbagai pelarut dari non polar sampai pada pelarut yang paling polar untuk dapat melihat kontribusi senyawa aktif yang berperan didalamnya.

Metoda

Penyiapan sampel dan ekstrak *Hyptis pectinata* Poit

Daun *Hyptis pectinata* Poit sebanyak 500g dikumpulkan dari desa Kanayakan, Dago Timur Bandung. Daun dipotong-potong dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 60°C. Simplisia yang telah kering dibuat serbuk, kemudian dimaserasi menggunakan pelarut metanol. Ekstrak metanol yang diperoleh dikentalkan dengan vacum rotary evaporator sampai 1/3 volum dan selanjutnya ditambahkan akuades (1:1) dan dibiarkan semalam untuk memisahkan klorofilnya. Terhadap ekstrak air dilakukan fraksinasi dengan berbagai pelarut yakni heksan, diklorometan dan etilasetat.

Uji aktivitas toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach

Perlakuan uji sitotoksitas dilakukan sebanyak 3 kali ulangan pada ekstrak metanol. Penyiapan larva *Artemia salina* Leach dengan menetasakan telur *Artemia salina* Leach 48 jam sebelum dilakukan uji. Kemudian dibuat larutan induk yaitu dengan cara mencampurkan 0,05 gram ekstrak etanol dan selanjutnya dibuat konsentrasi masing-masing larutan menjadi 1000, 100, 10 ppm. Sebagai kontrol air laut kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* Leach. Pengamatan dilakukan selama 24 jam terhadap kematian larva udang, dihitung dan ditentukan prosentase kematian [1]. Analisis data dilakukan untuk mencari LC_{50} dengan analisis probit.

Uji sitotoksik pada sel kanker payudara (MCF-7)

Kultur sel kanker. Sel yang digunakan pada penelitian ini adalah sel MCF-7 yang diperoleh dari ATTC yang dirawat dan ditumbuhkan pada medium DMEM (Gibco) dengan 10% FBS (Gibco) dan 2% Penicillin-Streptomycin (Gibco), 0,5% fungizon.

Panen Sel MCF-7. Sel dilihat dibawah mikroskop, kalau sudah konfluen 80-90%. Buang medium yang ada dalam flash dan cuci medium (medium tanpa PBS), masukkan dalam flash. Kemudian goyang-goyang untuk menghilangkan sisa-sisa PBS yang masih menempel pada sel, kemudian buang. Tambahkan tripsin-EDTA 0,25% 1-2 mL. Diamkan sebentar, kalau sel sudah lepas semprot, masukkan ke tabung sentrifus, tambahkan medium sampai penuh. Sentrifus selama 10 menit kecepatan 1500 rpm. Buang supernatan, pelet dan tambahkan 1 mL medium komplit dihomogenkan. Hitung sel yang didapat (sel siap untuk diuji). Pada microplate 96 well tambahkan masing-masing sebanyak 100 μ L suspensi sel dengan kepadatan 2×10^4 /20.000 sel/well dan kemudian diamkan 1-2 jam. Setelah itu tambahkan 100 μ L ekstrak dengan berbagai konsentrasi. Inkubasi dalam inkubator CO₂ selama 24 jam (kadar CO₂ 5%, suhu 37°C, kelembabam 98%). Setelah 24 jam dilihat dibawah mikroskop dan difoto, Setelah itu buang medium yang ada dan tambahkan 100 μ L MTT pada masing-masing well. Inkubasi selama 4-6 jam dan kemudian tambahkan stop solution 100 μ l pada masing-masing well. Inkubasi selama satu malam. Deteksi lebih lanjut dengan ELISA pada panjang gelombang 550 nm.

Analisis hasil

Persentase sel mati dengan rumus:

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{Abs sel dgn perlakuan} - \text{Abs kontrol media}}{\text{Abs kontrol media Sel} - \text{Abs kontrol media}} \times 100\%$$

Aktivitas antikanker dinyatakan dalam IC₅₀ (konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel).

Hasil dan Pembahasan

Uji toksisitas dengan Metode BSLT oleh Meyer dkk [1]

Metode brine shrimp lethality Test (BSLT) digunakan untuk mempelajari toksisitas sampel secara umum dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. Uji toksisitas masing-masing ekstrak memperlihatkan hasil seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pengamatan uji toksisitas *Hyptis pectinata* Poit pada *Artemia salina* Leach

Sampel	LC ₅₀ (μ g/mL)
Ekstrak metanol	185,63
Fraksi heksan	128,45
Fraksi DCM	113,32
Fraksi etilasetat	92,54

Dari data pada Tabel 1. menunjukkan ekstrak methanol mempunyai aktivitas yang paling toksik diikuti oleh fraksi-fraksinya seperti fraksi dengan pelarut heksan, diklorometana dan paling rendah adalah dengan fraksi etilasetat. Suatu zat dikatakan aktif atau toksik bila nilai LC₅₀ <1000 ppm untuk ekstrak dan < 30 ppm untuk suatu senyawa murni. Dari data yang didapatkan, ekstrak dan fraksinya adalah bersifat toksik. Hal ini mungkin disebabkan oleh kemampuan pelarut methanol dalam melarutkan senyawa biokatif paling baik. Disamping itu juga diperkirakan oleh adanya senyawa hiptolida dan pektinolida yang terdapat dalam daun *Hyptis pectinata* Poit [12]. Pelarut methanol digunakan untuk mengisolasi senyawa hiptolida yang terkandung dalam daun *Hyptis pectinata* [6, 13, 14].

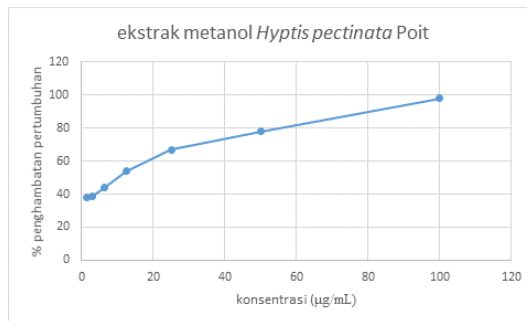
Uji sitotoksik dengan metoda MTT assay.

Hasil pendeteksian dengan metoda MTT assay menggunakan ELISA pada panjang gelombang 550 nm diperoleh data absorbansi yang dikonversi kedalam persen penghambatan pertumbuhan sel. Uji ini dilakukan untuk menentukan kadar sampel uji yang dapat menghambat pertumbuhan sel MCF-7 sampai 50% (IC₅₀). Pemeriksaan dilakukan pada sel kanker payudara MCF-7 diukur dengan MTT assay disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hambatan pertumbuhan sel MCF-7 dalam berbagai konsentrasi ekstrak

Analisis	Konsentrasi ekstrak ($\mu\text{g/mL}$)						
	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,562
% penghambatan	98	78	67	54	44	39	38

Dari table 2. menunjukkan bahwa pada konsentrasi tertinggi pada 100 $\mu\text{g/ml}$ mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara sebesar 98% dan pada konsentrasi terendah 1,562 $\mu\text{g/ml}$ memberikan penghambatan sebesar 38%.



Gambar 1. Grafik hubungan peningkatan konsentrasi ekstrak metanol terhadap persentase penghambatan pertumbuhan sel setelah inkubasi 24 jam

Gambar 1. terlihat kecenderungan bertambahnya konsentrasi mengakibatkan bertambahnya penghambatan sel. Grafik hubungan konsentrasi dan penghambatan sel dapat ditentukan nilai IC_{50} dengan persamaan garis linier. Persamaan regresi linier diperoleh pada $y=0,604x+42,586$ dengan nilai $r^2=0,9275$. Dengan menghitung nilai x pada hambatan 50% diperoleh nilai IC_{50} ekstrak metanol *Hyptis pectinata* Poit pada 18,90 $\mu\text{g/mL}$. Dengan demikian ekstrak *Hyptis pectinata* Poit memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7. Nilai IC_{50} yang diperoleh dibawah 100 $\mu\text{g/mL}$, mengindikasikan adanya potensi ekstrak metanol *Hyptis pectinata* Poit sebagai agen kemoprevensi, sehingga perlu dikembangkan lebih lanjut.

Hasil penelitian ini menunjukkan potensi ekstrak *Hyptis pectinata* Poit bersifat sebagai sitotoksik dan menunjukkan aktivitas antikanker yang baik, sehingga mempunyai peluang untuk dikembangkan

untuk obat antikanker. Karena nilai LC_{50} *Hyptis pectinata* tersebut cukup menjanjikan untuk dikembangkan sebagai alternatif pengobatan kanker mengingat pada percobaan ini digunakan sel MCF-7 yang diketahui memiliki sifat resistensi yang tinggi terhadap beberapa agen kemoterapi.

Kesimpulan

Ekstrak *Hyptis pectinata* Poit bersifat sebagai sitotoksik pada larva udang *Artemia salina* leach dan sel kanker payudara MCF-7.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini sebagian dana dibiayai oleh DP2M Ditjen DIKTI Departemen Pendidikan Nasional dalam Hibah fundamental Tahun Anggaran 2013. Melalui DIPA No. 023.04.02.189185/2013 Tanggal 5 Desember 2012

Daftar Pustaka

- [1] B. N. Meyer, N. R. Ferrigni, J. E. Putnam, L. B. Jacobsen, D. E. Nichols, J. L. McLaughlin, (1982), *Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents*, *Planta Med*, 45 (05), 31-34 10.1055/s-2007-971236
- [2] R. Ian Freshney, (1986), *Animal cell culture: a practical approach*, IRL press Oxford,;
- [3] Anieta M Sieuwerts, Jan GM Klijn, Harry A Peters, John A Foekens, (1995), *The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized: How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolic Activity of Cell Cultures in vitro for the Assessment of Growth Characteristics, IC50-Values and Cell Survival*, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 33 (11), 813-824
- [4] Jun-ya Ueda, Yasuhiro Tezuka, Arjun Hari Banskota, Quan Le Tran, Qui Kim Tran, Yuko Harimaya, Ikuo Saiki, Shigetoshi Kadota, (2002), *Antiproliferative activity of Vietnamese medicinal plants*, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25 (6), 753-760
- [5] Heloína de S Falcão, Igara O Lima, Vanda L dos Santos, Harlan de F Dantas, Margareth de FFM Diniz, José M Barbosa-Filho, Leônia M Batista, (2005), *Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil*, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15 (4), 381-391

- [6] Rogelio Pereda-Miranda, Lourdes Hernández, Manuela Judith Villavicencio, Miriam Novelo, Patricia Ibarra, Heebyung Chai, John M. Pezzuto, (1993), *Structure and stereochemistry of pectinolides AC, novel antimicrobial and cytotoxic 5, 6-dihydro- α -pyrones from Hyptis pectinata*, Journal of natural products, 56 (4), 583-593
- [7] Gustavo B. Melo, Renata L. Silva, Valdinaldo A. Melo, Ângelo R. Antonioli, M. E. Jordani Souza, M. C. Jordani, O. Castro-E-Silva, (2005), *Effect of the aqueous extract of Hyptis pectinata on liver mitochondrial respiration*, Phytomedicine, 12 (5), 359-362
- [8] Gustavo B Melo, Renata L Silva, Valdinaldo A Melo, Sônia O Lima, Ângelo R Antonioli, Tiago Castro-E-Silva, Luis G Marcassa, Vanderlei S Bagnato, Sérgio Zucoloto, Leandra NZ Ramalho, (2005), *Enhancement of liver regeneration by the association of Hyptis pectinata with laser therapy*, Digestive diseases and sciences, 50 (5), 949-954
- [9] M. D. Bispo, R. H. V. Mourão, E. M. Franzotti, K. B. R. Bomfim, M. de F. Arrigoni-Blank, M. P. N. Moreno, M. Marchioro, A. R. Antonioli, (2001), *Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of Hyptis pectinata leaves in experimental animals*, Journal of ethnopharmacology, 76 (1), 81-86
- [10] M. F. Arrigoni-Blank, A. R. Antonioli, L. C. Caetano, D. A. Campos, A. F. Blank, P. B. Alves, (2008), *Antinociceptive activity of the volatile oils of Hyptis pectinata L. Poit.(Lamiaceae) genotypes*, Phytomedicine, 15 (5), 334-339
- [11] Tim Mosmann, (1983), *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*, Journal of Immunological Methods, 65 (1), 55-63 [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- [12] Meiny Suzery, Merry Gultom, Bambang Cahyono, (2013), *Senyawa Hiptolida dan Pektinolida dalam Fraksi Diklorometana dari Daun Hyptis pectinata Poit*, Journal Sains dan Matematika, 21 (2), 31-34
- [13] K. Gorter, (1920), *Hyptolide, a bitter principle of Hyptis pectinata, Poit*, Bulletin du Jardin Botanique de Buitenzorg, 327-337
- [14] A. J. Birch, D. N. Butler, (1964), 799. *The structure of hyptolide*, J. Chem. Soc., 4167-4168