

**Aktivitas Antikanker Fraksi Ekstrak Kloroform Rumput Knop  
(*Hyptis capitata* Jacq.) pada Sel T47D dan WiDr:  
Kajian Seluler dan Molekuler serta Identifikasi Isolat Aktif**

**Nelsiani To'bungan  
18/435301/SBI/00154**

**Intisari**

Kanker payudara dan kanker kolorektal merupakan jenis kanker yang tinggi insidensinya di dunia. Salah satu metode penanganan kanker yang sering digunakan adalah kemoterapi. Kemoterapi memiliki efek samping yang berdampak buruk pada kualitas hidup pasien. Upaya tambahan penyembuhan kanker dilakukan dengan memanfaatkan senyawa bioaktif dari alam sebagai agen kemopreventif, yang diharapkan memiliki efek samping yang lebih kecil. *H. capitata* memiliki sejarah etnobotani. Senyawa yang diisolasi dari daun dan batangnya telah dilaporkan memiliki aktivitas sitotoksik. Pada penelitian ini akar, batang, daun dan bunga *H. capitata* diekstraksi secara terpisah dengan maserasi bertingkat yang diawali dengan pelarut kloroform dan dilanjutkan dengan metanol. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis: 1) variasi sitotoksitas ekstrak kloroform dan metanol akar, batang, daun dan bunga *H. capitata* terhadap sel T47D dan WiDr, 2) kemampuan sitotoksitas ekstrak terpilih *H. capitata* terhadap sel T47D dan WiDr dibandingkan terhadap sel Vero, 3) fraksi dan isolat yang memiliki sitotoksitas tertinggi terhadap sel T47D, 4) sitotoksitas isolat paling aktif *H. capitata* terhadap sel T47D dan Vero, 5) mekanisme seluler dan molekuler aksi antikanker isolat paling aktif dari ekstrak *H. capitata* terhadap sel T47D yang meliputi kemampuan antimetastasis, induksi apoptosis, kemampuan antiproliferasi, siklus sel, 6) senyawa pada isolat paling aktif *H. capitata* yang berperan dalam aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D. Uji sitotoksitas dilakukan dengan metode MTT untuk memperoleh nilai IC<sub>50</sub>. Fraksinasi dilakukan dengan 2 kali VLC dan 1 kali KLTP. Uji antimetastasis dilakukan dengan *scratch wound healing assay*, uji apoptosis dengan *anexin V-PI* flowsitometri, uji antiproliferasi dengan *doubling time-MTT*, siklus sel dengan flowsitometri. Penelusuran jalur apoptosis yang terjadi dilakukan dengan uji imunositokimia ekspresi *caspase* 8 dan 9. Uji kandungan senyawa dalam ekstrak terpilih, fraksi dan isolat paling aktif dilakukan dengan GC-MS. Ekstraksi menghasilkan 8 ekstrak kasar. Hasil skrining sitotoksitas ekstrak kasar berdasarkan nilai IC<sub>50</sub>, menunjukkan ekstrak kloroform akar dan metanol memiliki aktifitas sitotoksitas yang moderat terhadap sel T47D dan WiDr. Tingkat sitotoksitas ekstrak kloroform dan methanol akar lebih baik dibanding ekstrak lainnya. Oleh sebab itu, keduanya dipilih untuk

dilanjutkan pada uji sitotoksitas terhadap sel Vero, untuk menentukan indeks selektifitas. Nilai indeks selektifitas (IS) perlakuan ekstrak kloroform dan methanol akar pada sel T47D dan WiDr berturut-turut adalah 1,22; 0,95; 0,33; dan 0,80, yang dikategorikan tidak selektif. Meskipun demikian, nilai IS ekstrak kloroform akar pada sel T47D lebih baik dibanding nilai IS pada sel WiDr. Ekstrak kloroform akar dipilih untuk dilanjutkan pada tahap fraksinasi. Fraksinasi tahap I, pada ekstrak kloroform akar menghasilkan 1 fraksi tunggal (F1) dan 3 fraksi gabungan (F2, F3, F4). Hasil uji sitotoksitas fraksi menunjukkan fraksi F2 (nheksan:kloroform (3:5) (v/v)) bersifat sangat toksik ( $IC_{50}$ : 13,8  $\mu\text{g/mL}$ ) terhadap sel T47D, dengan nilai IS 3,71 yang tergolong selektif. F2 disebut fraksi paling aktif I. F2 dilanjutkan pada fraksinasi tahap II, dan diperoleh 3 fraksi tunggal (F2.1, F2.2, F2.3) dan 1 fraksi gabungan (F2.4). Hasil uji sitotoksitas fraksi tersebut menunjukkan fraksi F2.2 (nheksan:kloroform:etil asetat (3:1:1) (v/v)) bersifat sangat toksik ( $IC_{50}$ : 17,29  $\mu\text{g/mL}$ ) terhadap sel T47D, dengan nilai IS 7,01 yang tergolong selektif. Fraksi F2.2 disebut fraksi paling aktif II dan dilanjutkan pada tahap KLTP, sehingga diperoleh 5 isolat (IS1-IS5). Uji sitotoksitas isolat menunjukkan bahwa IS4 bersifat sangat toksik ( $IC_{50}$ : 19,44  $\mu\text{g/mL}$ ) terhadap sel T47D, dengan nilai IS 5,71 yang tergolong selektif. IS4 disebut isolat paling aktif. Isolat paling aktif menunjukkan aktivitas antimetastasis, kemampuan induksi apoptosis, antiproliferasi dan kemampuan memicu *arrest* pada fase Sub G1 dan G1 siklus sel pada sel T47D. Perlakuan 10 dan 20  $\mu\text{g/mL}$  isolat paling aktif memicu apoptosis melalui jalur intrinsik maupun ekstrinsik. Identifikasi senyawa dengan analisis GC-MS berdasarkan *library search*, dipilih senyawa yang memiliki indeks kemiripan paling baik. Adapun senyawa yang diduga terkandung dalam *H. capitata* dan berperan dalam aktivitas sitotoksitas adalah *hexadecanoic acid*; *9,12-octadecadienoic acid (Z,Z)- methyl ester*; *methyl stearate*; *retinoic acid*;  $\alpha$ -sitosterol; *campesterol*; *pterin-6-carboxylic acid*; *9,12,15-octadecatrienoic acid*; *ferruginol* dan *stigmasterol*. Ferruginol dideteksi baik pada ekstrak kloroform akar, fraksi paling aktif I dan II serta isolat paling aktif. Metabolit sekunder yang diduga terkandung dalam *H. capitata* diduga bekerja secara antagonis. *H. capitata* berpotensi untuk dikembangkan sebagai kandidat antikanker di masa yang akan datang.

**Kata kunci:** sitotoksitas, antimetastasis, apoptosis, penghambatan siklus sel, GC-MS,

**Anticancer Activity of Knobweed (*Hyptis capitata* Jacq.) Fraction of  
Chloroform Extract on T47D and WiDr Cells:  
Cellular and Molecular Studies and Identification of Active Isolates**

**Nelsiani To'bungan**  
**18/435301/SBI/00154**

**Abstract**

Breast and colorectal cancer are types of cancer with a high incidence in the world. One of the most commonly used cancer treatment methods is chemotherapy. Chemotherapy has side effects that adversely affect the patient's quality of life. Additional efforts to cure cancer are carried out by utilizing bioactive compounds from nature as chemopreventive agents, which are expected to have fewer side effects. *H. capitata* has ethnobotanical history. Compounds that isolated from the leaves and stems have been reported have cytotoxic activity. In this study, the roots, stems, leaves and flowers of *H. capitata* were extracted separately by graded maceration starting with chloroform and followed by methanol. This study conducted to analyze: 1) cytotoxicity variation of chloroform and methanol extracts of roots, stems, leaves and flowers of *H. capitata* against T47D and WiDr cells, 2) cytotoxicity of the selected extract *H. capitata* against T47D and WiDr cells compared to Vero cells, 3) fractions and isolates that had the highest cytotoxicity against T47D cells, 4) cytotoxicity of the most active isolate of *H. capitata* against T47D and Vero cells, 5) cellular and molecular mechanisms anticancer action of the most active isolate of *H. capitata* extract against T47D cells which include antimetastasis, apoptosis induction, antiproliferative ability, cell cycle, 6) phytochemical compounds contained in most active isolate of *H. capitata* that play a role in cytotoxic activity against T47D cell. Cytotoxicity assay was carried out using the MTT method to obtain IC<sub>50</sub> value. Fractionation was carried out with 2 times VLC and 1 time KLTP. Antimetastasis assay was performed by scratch wound healing assay, apoptosis test by annex V-PI flowcytometry, antiproliferation test by doubling time-MTT, cell cycle by flowcytometry. Tracing the apoptotic pathways that occurred was carried out by immunocytochemical tests of caspase 8 and 9 expression. Phytochemical compounds detection in the selected extracts, fractions and the most active isolates were carried out by GC-MS. Extraction yielded 8 crude extracts. Crude extract cytotoxicity screening based on IC<sub>50</sub> value showed that chloroform and methanol root extract had moderate cytotoxic activity against T47D and WiDr cells. The cytotoxicity level of chloroform and root methanol

extracts was better than other extracts. Therefore, both of them were chosen to be continued in the cytotoxicity test against Vero cells, to determine the selectivity index. The selectivity index (SI) values for chloroform and root methanol extract treatment in T47D and WiDr cells were 1.22; 0.95; 0.33; and 0.80, which are categorized as non-selective. However, the SI value of root chloroform extract in T47D cells was better than the SI value in WiDr cells. Root chloroform extract has been selected for fractionation. Phase I fractionation, the root chloroform extract obtained 1 single fraction (F1) and 3 combined fractions (F2, F3, F4). Cytotoxicity test showed that the F2 fraction (n-hexane:chloroform (3:5) (v/v)) was highly toxic ( $IC_{50}$ : 13.8  $\mu\text{g/mL}$ ) against T47D cells, with a selectivity index of 3.71, which was classified as selective. F2 was called the most active fraction I. F2 was continued in the fractionation stage II, and obtained 3 single fractions (F2.1, F2.2, F2.3) and 1 combined fraction (F2.4). Cytotoxicity test showed that fraction F2.2 (n-hexane:chloroform:ethyl acetate (3:1:1) (v/v)) was highly toxic ( $IC_{50}$ : 17.29  $\mu\text{g/mL}$ ) against T47D cells, with a selectivity index of 7.01, which is classified as selective. F2.2 was called the most active fraction II and was continued at the KLTP stage, that obtained 5 isolates (IS1-IS5). The cytotoxicity test of the isolate showed that IS4 was highly toxic ( $IC_{50}$ : 19.44  $\mu\text{g/mL}$ ) against T47D cells, with a selectivity index of 5.71 which was classified as selective. IS4 was called the most active isolate. The most active isolate showed antimetastatic activity, the ability to induce apoptosis, antiproliferation and the ability to trigger arrest in the Sub G1 and G1 phases of the cell cycle in T47D cells. Treatment of 10 and 20  $\mu\text{g/mL}$  the most active isolate, triggering apoptosis through intrinsic and extrinsic pathways. Identification of compounds by GC-MS analysis based on library search, based on the best similarity index. The compounds thought to be contained in *H. capitata* and play a role in cytotoxicity activity are hexadecanoic acid; 9,12-octadecadienoic acid (Z,Z)- methyl ester; methyl stearate; retinoic acid; -sitosterol; campesterol; pterin-6-carboxylic acid; 9,12,15-octadecatrienoic acid; ferruginol and stigmasterol. Ferruginol was detected in both the root chloroform extract, the most active fractions I and II and the most active isolate. The secondary metabolites thought to be contained in *H. capitata* are thought to act antagonistically. *H. capitata* has the potential to be developed as an anticancer candidate in the future.

**Keywords:** cytotoxicity, antimetastasis, apoptosis, cell cycle arrest, GC-MS.