

Uji Sitotoksisitas dan Proliferasi Senyawa 1-(4-Trifluorometilbenzoiloksimetil)-5-Fluorourasil terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7

(Cytotoxicity and Proliferation Assay of 1-(4-Trifluoromethylbenzoyloxymethyl)-5-Fluorouracil) On MCF-7 Breast Cancer Cell Lines)

Puspita Arum Wijayanti, Ayik Rosita Puspaningtyas, Dian Agung Pangaribowo
Fakultas Farmasi, Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail korespondensi: puspitaarum10@gmail.com

Abstract

1-(4-trifluoromethylbenzoyloxymethyl)-5-fluorouracil (TFU) is a derivative compound of anticancer agent, 5-fluorouracil (5-FU). TFU has been synthesized by Ernawati to increase the anticancer activity of 5-FU. However, the cytotoxic and antiproliferative effect of TFU had not been carried out. This study aimed to evaluate the cytotoxic and antiproliferative activity of TFU compared to 5-FU on MCF-7 breast cancer cell line using MTT method. The cytotoxicity study was done for 24 hours. The antiproliferative study was done for 24, 48, and 72 hours. The cytotoxic effect was determined based on IC_{50} value while the antiproliferative effect was determine based on the doubling time value. The results showed that TFU had better cytotoxicity on MCF-7 with IC_{50} value $401.03 \pm 0.370 \mu\text{M}$ compared to 5-FU with IC_{50} value $4216.32 \pm 800.28 \mu\text{M}$. The doubling time value of TFU at concentration of $\frac{1}{2} IC_{50}$, IC_{50} , and $1\frac{1}{2} IC_{50}$ were 359.66; 364.39; and 448.40 hours respectively, while 5-FU were 184.45; 214.00; and 220.63 hours. The doubling time value indicated that TFU compound was able to prolong the doubling time of MCF-7 cell line compared to 5-FU.

Keywords: cancer, cytotoxicity, proliferasi, 1-(4-trifluoromethylbenzoyloxymethyl)-5-fluorouracil, MCF-7

Abstrak

Senyawa 1-(4-trifluorometilbenzoiloksimetil)-5-fluorourasil atau TFU merupakan salah satu agen antikanker turunan senyawa 5-fluorourasil (5-FU) yang telah berhasil disintesis Ernawati. Namun pengujian terhadap efek sitotoksik dan proliferasinya belum dilakukan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek sitotoksik dan proliferasi senyawa TFU dibandingkan dengan 5-FU pada sel kanker payudara MCF-7 dengan metode MTT. Uji sitotoksik dilakukan dengan menginkubasi sel MCF-7 dengan perlakuan menggunakan senyawa TFU dan 5-FU selama 24 jam untuk menentukan nilai IC_{50} . Uji antiproliferasi dilakukan dengan menghitung nilai *doubling time* sel dengan perlakuan TFU dan 5-FU. Hasil uji sitotoksik menunjukkan bahwa senyawa TFU memiliki efek sitotoksik yang lebih besar dengan nilai $IC_{50} = 401,03 \pm 0,370 \mu\text{M}$ daripada 5-FU dengan $IC_{50} = 4216,32 \pm 800,28 \mu\text{M}$. Nilai *doubling time* senyawa TFU yaitu sebesar 359,66; 364,39; dan 448,40 jam pada konsentrasi $\frac{1}{2} IC_{50}$, IC_{50} , dan $1\frac{1}{2} IC_{50}$ sementara 5-FU sebesar 184,45; 214,00; dan 220,63 jam pada konsentrasi $\frac{1}{2} IC_{50}$, IC_{50} , dan $1\frac{1}{2} IC_{50}$. Hasil uji *doubling time* tersebut menunjukkan bahwa senyawa TFU mampu menghambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7 lebih lama dibandingkan senyawa 5-FU.

Kata kunci: kanker, sitotoksisitas, proliferasi, 1-(4-trifluorometilbenzoiloksimetil)-5-fluorourasil, MCF-7

Pendahuluan

Kanker merupakan penyakit yang kompleks dengan ciri-ciri transduksi sinyal proliferasi dalam waktu lama, terjadinya penurunan penekan pertumbuhan, penurunan kematian sel, replikasi yang berlangsung terus-menerus, perangsangan angiogenesis, dan terjadi invasi serta metastasis. Kemampuan kanker tersebut terjadi akibat ketidakstabilan genetik [1]. Berdasarkan data statistik yang dikeluarkan WHO pada tahun 2013, jenis kanker yang paling sering terjadi adalah kanker paru-paru, payudara, dan kolorektal. WHO juga menekankan bahwa kanker payudara merupakan penyebab utama kematian pada wanita yang menderita kanker. Di Indonesia, kematian akibat penyakit kanker payudara sebesar 21,4 % pada tahun 2012 [2].

Salah satu penanganan penyakit kanker payudara adalah dengan melakukan kemoterapi. Namun, saat ini dari berbagai macam agen kemoterapi yang ada, efektivitasnya masih belum maksimal dalam mengobati kanker payudara [3]. Oleh karena itu, dibutuhkannya sintesis obat baru dengan cara pengembangan obat dan usaha penemuan obat baru melalui modifikasi struktur [4].

Salah satu pengembangan senyawa antikanker baru adalah pengembangan turunan 5-fluorourasil (5-FU). 5-FU hingga saat menjadi salah satu *first line* dalam kemoterapi penyakit kanker payudara invasif ataupun non invasif [5]. Turunan 5-FU yang sudah berhasil dikembangkan adalah senyawa 1-(4-trifluorometil benzoiloksimetil)-5-fluorourasil (TFU) [6].

TFU telah berhasil disintesis oleh Ernawati dengan melalui substitusi gugus alkil benzena, ester dan CF_3 pada posisi *-para* [6]. Berdasarkan teori HKSA dan pendekatan Topliss, penambahan gugus-gugus dan substituen tersebut dapat meningkatkan aktivitas senyawa TFU melalui peningkatan sifat lipofilik, sterik dan elektronik [4]. Namun, pengujian terhadap aktivitas antikanker senyawa tersebut belum dilakukan.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas sitotoksik dan efek antiproliferasi dari senyawa TFU terhadap sel kanker payudara MCF-7 dibandingkan dengan senyawa 5-FU. Sel kanker payudara MCF-7 dipilih karena sel tersebut mengekspresikan p53 *wild type* [7] sehingga masih sensitif terhadap agen kemoterapi [8]. Selain itu, mekanisme 5-FU umumnya melalui jalur transduksi p53 [9]. Uji

sitotoksik dan proliferasi dilakukan dengan metode MTT. Aktivitas sitotoksik dinyatakan dalam IC_{50} dan efek antiproliferasi dinyatakan dalam nilai *doubling time*. IC_{50} merupakan konsentrasi larutan uji yang dapat menghambat 50% pertumbuhan dan diperoleh melalui analisis probit [10]. Adanya perbedaan aktivitas antara senyawa TFU dan 5-FU dinilai dengan analisis statistik uji t sedangkan hasil uji *doubling time* senyawa TFU dibandingkan dengan senyawa 5-FU menggunakan grafik waktu inkubasi vs log jumlah sel hidup [11].

Metode Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *experimental laboratories* yang dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember dan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Alat yang digunakan adalah inkubator CO_2 5% (Heraeus Kendro Laboratories), *inverted microscope* (Carl Zeiss Axiovert 25), *hemocytometer* (Nebauer improved 0,100 mm Tiefe Depth Profondeur 0,0025 mm), mikropipet (VWR Brand), *cell counter, microplate reader* (Bio-Rad *Benchmark*), timbangan analitik (Sartorius), vortex (Thermolyne, Sybron), sentrifus (Universal 320 R Hettich), kamera digital (Canon IXY Digital 25 IS 10,0 mega pixels).

Bahan yang digunakan pada pengujian sitotoksik dan proliferasi adalah sel MCF-7 yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, 5-fluorourasil (prosintesis/Merck), DMSO (DMSO 99,5% pro GC, Sigma), *bovine serum albumin* (BSA), *phosphate buffer saline* (PBS) (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA), *Dulbecco's Modified Eagle Media* (DMEM), *foetal bovine serum* (FBS qualified, Gibco, Invitrogen™ USA), antibiotika penisilin-streptomisin 1% (v/v) (Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, 14072, USA), tripsin-EDTA 0,25% (Gibco, Invitrogen, Canada), MTT (Sigma, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA), dan natrium dodesil sulfat (SDS, Merck-Schuchardt, Dr.Th.Schuchardt & Co, D-85662 Hobenbrunn, Germany), *tissue culture disc* diameter 10 cm (Iwaki), *conical tube* 15 ml (BD Falcon), *yellow tip* dan *blue tip* (Brand), *microplate 96-well* (Nunc), dan *microtube*.

Penelitian ini diawali dengan sintesis senyawa TFU dan pemurnian dengan kromatografi kolom. Selanjutnya dilakukan uji kemurnian dengan KLT-densitometri, uji jarak lebur serta diidentifikasi strukturnya menggunakan FTIR-KBr. Berdasarkan uji kemurnian dan identifikasi struktur diperoleh senyawa TFU yang sesuai dengan hasil sintesis oleh Ernawati [6]. Kemudian dilanjutkan dengan uji sitotoksik dan uji *doubling time*.

Larutan uji 5-FU dan TFU dibuat dengan melarutkan sampel 5-FU sebesar 2,602 mg dan TFU sebesar 0,66 mg dalam 40 µl DMSO dan 360 µl PBS. Kemudian dilakukan pengenceran menggunakan media komplit DMEM hingga memperoleh konsentrasi uji sebesar 0,5; 5; 50 ; 25; 500; dan 5000 µM untuk senyawa 5-FU dan 0,5; 5; 50; dan 500 µM untuk senyawa TFU.

Uji sitotoksitas dilakukan dengan menanam sel pada *microplate* 96-sumuran sehingga diperoleh kepadatan 5×10^3 sel/sumuran dan diinkubasi selama 24 jam untuk mendapatkan pertumbuhan yang baik. Setelah itu medium diganti dengan medium baru kemudian ditambahkan larutan TFU atau 5-FU pada berbagai konsentrasi menggunakan kosolven DMSO dengan konsentrasi tidak lebih dari 1%. Selanjutnya sel diinkubasi pada 37°C dalam inkubator CO₂ 5% selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media dan senyawa dibuang kemudian sel dicuci dengan PBS. Pada masing-masing sumuran, ditambahkan 100 µl media kultur dan 10 µl MTT 5 mg/ml. Sel diinkubasi kembali selama 4-6 jam dalam inkubator CO₂ 5%, 37°C. Reaksi MTT dihentikan dengan menambahkan SDS 10% setelah 4 jam. Absorbansi dibaca dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm. Data absorbansi yang diperoleh dari uji sitotoksik dikonversi ke dalam persen sel hidup menggunakan rumus berikut:

$$\text{Sel hidup (\%)} = \frac{(\text{Abs. perlakuan} - \text{Abs. kontrol media})}{(\text{Abs. kontrol sel} - \text{Abs. kontrol media})} \times 100\%$$

Persentase sel hidup yang diperoleh dari persamaan di atas kemudian digunakan untuk menghitung IC₅₀ dengan menggunakan analisis probit. Perbedaan IC₅₀ antara TFU dan 5-FU dinilai dengan analisis statistik uji t dengan taraf kepercayaan 95%. Perbedaan signifikan ditunjukkan dengan nilai signifikansi <0,05 [12].

Uji *doubling time* dilakukan dengan menanam sel MCF-7 pada *microplate* 96 sumuran dengan kepadatan 5×10^3 sel/sumuran dan diinkubasi selama 24 jam. Senyawa 5-FU dan TFU dengan konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀, dan $1\frac{1}{2}$ IC₅₀ ditambahkan ke dalam sumuran dan dilakukan sampling pada jam ke-24, 48 dan 72. Proliferasi sel diamati dengan metode MTT seperti yang dilakukan pada uji sitotoksik.

Data absorbansi yang diperoleh dari uji *doubling time* kemudian dikonversi ke dalam % sel hidup dan dibuat kurva antara waktu inkubasi vs log jumlah sel hidup. Persamaan linier yang diperoleh dari kurva antara waktu inkubasi vs log jumlah sel hidup dapat digunakan untuk menghitung nilai *doubling time*. Nilai *doubling time* dihitung dengan rumus:

$$\text{Doubling time} = \frac{y - a}{b}$$

Keterangan:

y = log 2x jumlah sel awal

a = *intersep*

b = *slope* [11]

Hasil Penelitian

Uji sitotoksik senyawa TFU dan 5-FU menghasilkan IC₅₀ yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji sitotoksitas senyawa 5-FU dan TFU terhadap sel MCF-7 dengan metode MTT.

Senyawa	IC ₅₀ (µM)	RSD (%)
TFU	401,03 ± 0,370 ^a	0,09
5-FU	4216,32 ± 800,28 ^b	18,98

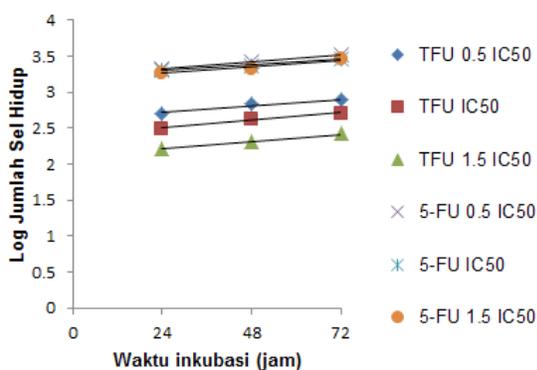
Keterangan: Data disajikan dalam rata-rata ± SD (n=3). Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan yang bermakna berdasarkan uji t dengan taraf α= 5%.

Pada Tabel 1. dapat dilihat rata-rata nilai IC₅₀ senyawa TFU lebih rendah dari IC₅₀ senyawa 5-FU. Hasil dari uji t tidak berpasangan menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna antara nilai IC₅₀ senyawa 5-FU dan TFU (p<0,05).

Hasil uji *doubling time* senyawa 5-FU dan TFU terhadap sel MCF-7 dapat dilihat pada Tabel 2. sedangkan kurva kinetika proliferasi senyawa 5-FU dan senyawa TFU dapat dilihat pada Gambar 1.

Tabel 2. Hasil uji *doubling time* senyawa TFU dan 5-FU terhadap sel MCF-7 dengan metode MTT.

Senyawa	Konsentrasi (μM)	<i>Doubling time</i> (jam)
TFU	$\frac{1}{2} \text{IC}_{50}$	359,66
	IC_{50}	364,39
	$1\frac{1}{2} \text{IC}_{50}$	448,40
5-FU	$\frac{1}{2} \text{IC}_{50}$	184,45
	IC_{50}	214,00
	$1\frac{1}{2} \text{IC}_{50}$	220,63



Gambar 1. Kurva kinetika proliferasi senyawa 5-FU dan senyawa TFU.

Pembahasan

Besar aktivitas sitotoksik suatu senyawa dapat dilihat dari nilai IC_{50} nya. Semakin kecil nilai IC_{50} suatu senyawa maka semakin besar aktivitas sitotoksiknya. Berdasarkan hasil uji sitotoksik senyawa TFU (Tabel 1) menunjukkan bahwa senyawa TFU memiliki aktivitas sitotoksik sepuluh kali lebih tinggi dibandingkan senyawa 5-FU sementara berdasarkan hasil uji t, antara IC_{50} senyawa TFU dan 5-FU terdapat perbedaan yang bermakna.

Senyawa TFU memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih besar dibandingkan senyawa 5-FU karena pada senyawa TFU memiliki substituen berupa senyawa ester dan alkil CF_3 yang memiliki nilai elektronegativitas yang lebih besar sehingga ikatan senyawa TFU dengan reseptor lebih kuat. Substitusi pada posisi *-para* juga meningkatkan parameter sterik sehingga interaksinya dengan reseptor lebih serasi. Gugus benzen yang dimiliki senyawa TFU meningkatkan lipofilitas senyawa sehingga penembusan obat melalui membran biologis

lebih baik dibandingkan senyawa 5-FU [4]. Peningkatan lipofilitas ini dapat dilihat dari nilai log P senyawa. Nilai log P yang baik agar suatu senyawa dapat mencapai reseptor target adalah $\pm 1-2$ [4]. Nilai log P senyawa TFU lebih tinggi dibandingkan senyawa 5-FU. Log P senyawa TFU sebesar 1,86 [6] sementara nilai log P senyawa 5-FU sebesar (-0,577) [4].

Aktivitas sitotoksik senyawa TFU lebih tinggi apabila dibandingkan dengan turunan senyawa 5-FU lain seperti senyawa 1-(3,4-diklorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil (DC). Perbedaan aktivitas ini terlihat dari nilai IC_{50} senyawa DC yang lebih besar dibandingkan senyawa TFU yaitu 889,744 μM [13]. Hal tersebut disebabkan senyawa TFU memiliki nilai log P yang sesuai untuk mencapai reseptor target yaitu $\pm 1-2$ sementara senyawa DC memiliki log P lebih dari 2 yaitu 2,545 [13].

Uji *doubling time* dilakukan setelah diperoleh nilai IC_{50} . Uji *doubling time* dilakukan untuk mengetahui kemampuan senyawa TFU dalam menghambat proliferasi sel MCF-7 dibandingkan dengan senyawa 5-FU.

Hasil uji *doubling time* menunjukkan bahwa senyawa TFU memiliki nilai *doubling time* yang lebih besar dibandingkan senyawa 5-FU (Tabel 2). Nilai *doubling time* senyawa TFU yang lebih besar menunjukkan bahwa senyawa TFU mampu menghambat kinetika proliferasi sel MCF-7 lebih lama dibandingkan senyawa 5-FU. Selain itu, seiring bertambahnya konsentrasi maka nilai *doubling time* senyawa 5-FU dan TFU juga semakin besar (Tabel 2). Hal tersebut memperlihatkan bahwa semakin tinggi konsentrasi senyawa maka efek penghambatan proliferasi pada sel MCF-7 semakin besar.

Hasil uji *doubling time* juga menunjukkan bahwa baik pada senyawa 5-FU maupun senyawa TFU menunjukkan peningkatan jumlah sel hidup seiring bertambahnya waktu inkubasi (Gambar 1). Namun, pada perlakuan dengan senyawa TFU peningkatan jumlah sel hidup lebih kecil dan jumlah sel hidup lebih sedikit dibandingkan dengan perlakuan senyawa 5-FU. Hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa TFU mampu menghambat proliferasi sel MCF-7 lebih baik dibandingkan senyawa 5-FU. Mekanisme penghambatan proliferasi sel kanker bisa melalui jalur *cell cycle arrest* yang berkaitan dengan adanya apoptosis [14]. Sehingga untuk penelitian lebih lanjut perlu dilakukan uji apoptosis. Selain itu, juga perlu dilakukan pengujian pada sel normal dan sel kanker lainnya untuk mengetahui selektivitas senyawa TFU.

Simpulan dan Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dilakukan dapat disimpulkan bahwa senyawa TFU memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih besar daripada senyawa 5-FU berdasarkan nilai IC_{50} nya serta memiliki efek antiproliferatif terhadap sel MCF-7 yang lebih besar daripada senyawa 5-FU berdasarkan nilai *doubling time*.

Beberapa saran yang dapat dilakukan peneliti selanjutnya adalah melakukan uji apoptosis untuk mengetahui mekanisme penghambatan proliferasi senyawa TFU. Selain itu, perlu dilakukan pengujian selektivitas terhadap sel normal dan sel kanker lain.

Daftar Pustaka

- [1] Hanahan D & Weinberg RA. Hallmark of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144: 646-674.
- [2] World Health Organization [Internet]. Geneva: WHO; 2014 [cited 2014, 24 December]. Available from: <http://www.who.int/cancer/en/>.
- [3] Gampenrieder SP, Rinnerthaler G, & Greil R. Neoadjuvant chemotherapy and targeted therapy in breast cancer: past, present, and future. *IJO*. 2013; 1-13.
- [4] Siswandono, & Soekarjdo B. *Kimia medisinal Jilid 2*. Surabaya: Airlangga University Press; 2000.
- [5] MD Anderson Cancer Center. Breast cancer treatment algorithm. Texas : The University of Texas MD Anderson Cancer Center; 2013.
- [6] Ernawati N. Sintesis 1-(4-trifluorometilbenzoiloksimetil)-5-fluorourasil sebagai upaya pengembangan obat antikanker. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember; 2013.
- [7] Gartel, AL, Feliciano C, & Tyner AL. A new method for determining the status of p53 in tumor cell lines of different origin. *Oncology Res* [Internet]. 2015 [cited 2015 Jan 21]; 13(10): [about 4pp]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12725531>.
- [8] Crawford KW & Bowen WD. Sigma-2 receptor agonists activate a novel apoptotic pathway and potentiate antineoplastic drugs in breast tumor cell lines. *Cancer Res*. 2002; 6: 313- 322.
- [9] Longley DB, Harkin, DP, & Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Cancer Res*. 2003; 3(5): 330-338.
- [10] Meiyanto E, Susidarti RA, Handayani S, & Rahmi F. Ekstrak etanolik biji buah pinang (*Areca catechu* L.) mampu menghambat proliferasi dan memacu apoptosis sel MCF-7. *MFI*. 2008;19(1): 12 – 19.
- [11] Nuraini LH. Uji sitotoksitas, antiproliferatif, dan pengaruhnya terhadap ekspresi p53 dan Bcl2 dari fraksi etanol infusa daun teh (*Camellia sinensis* (L.) O.k.) terhadap sel HeLa. *MOT*. 2011; 16(1): 14-21.
- [12] Al- Saeedi FJ. Study of the cytotoxicity of asiaticoside on rats and tumour cells. *BMC Cancer*. 2014; 14: 220-233.
- [13] Fadhilah N. Uji sitotoksitas dan proliferasi senyawa 1-(3,4-diklorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil terhadap sel kanker payudara MCF-7. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember; 2015.
- [14] Meiyanto E, Sismindari, Candra L & Moordiani. Efek antiproliferatif ekstrak etanol daun dan kulit batang tanaman cangkkring (*Erythrina fusca* Lour.) terhadap sel HeLa. *MFI*. 2003; 14(3):124-131.