

Uji Sitotoksisitas dan Proliferasi Senyawa 1-(4-nitrobenzoiloksime- metil)-5-fluorourasil terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 (*Cytotoxicity and Proliferation Studies of 1-(4-nitrobenzoyloxy- methyl)-5-fluorouracil) on Breast Cancer Cells MCF-7*)

Eka Mustika Wati, Ayik Rosita Puspaningtyas, Dian Agung Pangaribowo
Fakultas Farmasi, Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail korespondensi: mustikaecha@gmail.com

Abstract

*1-(4-nitrobenzoyloxymethyl)-5-fluorouracil (4-NFU) is a derivative of anticancer drug 5-fluorouracil (5-FU) which has been substituted by alkyl, ester, benzene, and nitro groups at N1 position. 4-NFU has been synthesized by Kurnia but anticancer study has not been reported. This research aims to compare the cytotoxicity and antiproliferative activity between 4-NFU and 5-FU on MCF-7 cells. The cytotoxicity and antiproliferative activity were studied by MTT method. The cytotoxicity study was done for 24 hours. The antiproliferative study was done for 24, 48, and 72 hours. The result showed that cytotoxicity activity of 4-NFU ($IC_{50} = 134.039 \mu M$) was higher than 5-FU ($IC_{50} = 4211.508 \mu M$) on MCF-7 cells. Based on the unpaired *t* test, there was a significant difference between IC_{50} of 4-NFU and 5-FU ($\alpha < 0.05$). The antiproliferative study showed that there was a growth inhibition on MCF-7 cells. The doubling time value of 4-NFU was 290.51 hours at $\frac{1}{2} IC_{50}$; 350.97 hours at IC_{50} ; and 418.2 hours at $1\frac{1}{2} IC_{50}$. The doubling time value of 5-FU was 185.99 hours at $\frac{1}{2} IC_{50}$; 214 hours at IC_{50} ; and 220.63 hours at $1\frac{1}{2} IC_{50}$. The doubling time value of 4-NFU was higher than 5-FU so that antiproliferative activity of 4-NFU was higher than 5-FU on MCF-7 cells.*

Keywords: 1-(4-nitrobenzoyloxymethyl)-5-fluorouracil, cytotoxicity, proliferation, MCF-7

Abstrak

Senyawa 1-(4-nitrobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil (4-NFU) adalah turunan obat antikanker 5-fluorourasil (5-FU) yang telah disubstitusi alkil, ester, benzena, dan gugus nitro pada posisi N1. Sintesis 4-NFU telah dilakukan oleh Kurnia namun pengujian terhadap aktivitas antikanker belum dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan aktivitas sitotoksisitas dan antiproliferasi antara senyawa 4-NFU dan 5-FU terhadap sel MCF-7. Aktivitas sitotoksisitas dan antiproliferasi diuji dengan menggunakan metode MTT. Uji sitotoksisitas dilakukan selama 24 jam. Uji antiproliferasi dilakukan selama 24, 48 dan 72 jam. Hasilnya menunjukkan bahwa aktivitas sitotoksisitas senyawa 4-NFU ($IC_{50} = 134,039 \mu M$) lebih tinggi daripada senyawa 5-FU ($IC_{50} = 4211,508 \mu M$) terhadap sel MCF-7. Berdasarkan analisis statistik uji *t* tidak berpasangan, terdapat perbedaan yang signifikan antara nilai IC_{50} senyawa 4-NFU dan 5-FU. Hasil uji antiproliferasi menunjukkan bahwa terdapat penghambatan pertumbuhan terhadap sel MCF-7. Nilai *doubling time* 4-NFU sebesar 290,51 jam pada konsentrasi $\frac{1}{2} IC_{50}$; 350,97 jam pada konsentrasi IC_{50} ; dan 418,2 jam pada konsentrasi $1\frac{1}{2} IC_{50}$. Nilai *doubling time* 5-FU sebesar 185,99 jam pada konsentrasi $\frac{1}{2} IC_{50}$; 214 jam pada konsentrasi IC_{50} ; dan 220,63 jam pada konsentrasi $1\frac{1}{2} IC_{50}$. Nilai *doubling time* senyawa 4-NFU lebih tinggi daripada 5-FU sehingga aktivitas antiproliferasi senyawa 4-NFU lebih tinggi daripada 5-FU.

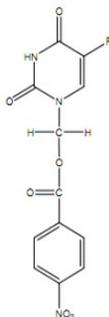
Kata kunci: 1-(4-nitrobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil, sitotoksisitas, proliferasi, MCF-7

Pendahuluan

Kanker merupakan penyakit yang disebabkan karena adanya genom abnormal, ditandai dengan adanya sinyal proliferasi secara terus-menerus, rusaknya gen penekan pertumbuhan, tidak adanya proses kematian sel, replikasi sel tidak terkendali, adanya rangsangan angiogenesis, sel mampu mengalami metastasis, dan menginvasif jaringan-jaringan di sekitarnya [1]. Kanker payudara merupakan penyakit yang paling sering diderita oleh wanita dan pada tahun 2012 terdapat 1,7 juta kanker payudara dengan jumlah kematian sebesar 522.000 [2]. Selain itu, kanker payudara lebih banyak terjadi di negara berkembang dan dapat terjadi mulai dari umur kurang dari 40 tahun hingga lebih dari 65 tahun [3].

Kanker dapat diatasi dengan cara melakukan pendekatan sistemik seperti kemoterapi [4]. 5-fluorourasil (5-FU) merupakan salah satu agen kemoterapi untuk mengobati kanker payudara yang memiliki mekanisme aksi mampu mengaktifasi p53 yang bertindak sebagai gen yang menekan pertumbuhan tumor dengan cara memicu apoptosis [5].

Kurnia [6] telah memodifikasi senyawa 5-FU dengan cara mensubstitusi gugus alkil, ester, benzena, dan nitro pada posisi N1 sehingga diperoleh senyawa 1-(4-nitrobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil (4-NFU). Struktur kimia senyawa 4-NFU dapat dilihat pada Gambar 1. Sintesis 4-NFU telah berhasil dilakukan namun pengujian terhadap aktivitasnya belum dilakukan [6]. Oleh karena itu, peneliti akan melakukan uji aktivitas antikanker pendahuluan berupa uji sitotoksisitas dan proliferasi *in vitro* terhadap senyawa 4-NFU menggunakan sel kanker payudara MCF-7.



Gambar 1. Struktur kimia senyawa 4-NFU

Sel MCF-7 biasa digunakan untuk berbagai penelitian kanker payudara *in vitro* karena sel MCF-7 merupakan sel kanker

payudara yang mengekspresikan gen p53 *wild type* (belum bermutasi) sehingga sensitif terhadap agen kemoterapi [7]. Selain itu, sel MCF-7 memiliki kemampuan untuk memproses estrogen dalam bentuk estradiol agar berikatan dengan reseptor estrogen dalam sitoplasma sehingga membentuk kompleks reseptor aktif [8] dan mempengaruhi transkripsi gen yang mengatur proliferasi sel [9].

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas sitotoksisitas dan antiproliferasi senyawa 4-NFU terhadap sel kanker payudara MCF-7. Uji sitotoksisitas untuk mendapatkan nilai *inhibition concentration 50* (IC₅₀) dan uji proliferasi untuk mendapatkan nilai *doubling time* dilakukan dengan menggunakan metode garam tetrazolium (MTT). Metode MTT merupakan metode kolorimetrik yang sensitif, kuantitatif, dan terpercaya untuk mengukur viabilitas, proliferasi, dan aktivitas sel. Dasar uji enzimatik MTT adalah dengan mengukur kemampuan sel hidup berdasarkan aktivitas mitokondria dari kultur sel [10].

Metode Penelitian

Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan adalah autoklaf (Hirayama Manufacturing Co., Jepang), *inverted microscope* (Carl Zeiss Axiovert 25, Germany), timbangan mikro, mikropipet (Pipetman^R neo Gilson, France), *ELISA reader* (Bio-Rad *microplate reader Benchmark serial* no. 11565, Jepang), mikroskop cahaya (Nikon YS 100, Japan), kamera digital (Canon IXY Digital 25 IS 10,0 mega pixels, Japan), sentrifus (Sorvall, MC 12 V 9700869), dan vortex (Maxi Mix II, Thermolyne type 37600 mixer, Iowa, USA).

Bahan-bahan yang digunakan adalah senyawa 4-NFU, 5-FU ≥ 99,0% prosintesis (Merck/818505), sel MCF-7 yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, *dimethyl sulfoxide* (DMSO) 99,5% pro GC), *phosphate buffer saline* (PBS) (Sigma-Aldrich), *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM), *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide* (MTT) (Sigma-Aldrich), sodium dodesil sulfat (SDS) (Merck), *microtube* 1 ml, *yellow tip* (Brand), *blue tip* (Brand), *96-well plate* (Nunc), dan aluminium foil.

Prosedur Penelitian

Penelitian ini dimulai dengan sintesis ulang senyawa 4-NFU [6] sebelum dilakukan uji

aktivitas sitotoksitas dan proliferasi terhadap sel kanker payudara MCF-7. Senyawa hasil sintesis tersebut kemudian diuji kemurnian dengan metode KLT-Densitometri dan penentuan jarak leleh serta diidentifikasi strukturnya menggunakan FTIR-KBr. Dari pengujian tersebut, didapatkan senyawa hasil sintesis yang sama dengan senyawa 4-NFU yang berhasil disintesis oleh Kurnia [6].

Preparasi larutan senyawa 4-NFU dan 5-FU

Ditimbang senyawa 4-NFU dan 5-FU, masing-masing 0,62 mg dan 2,602 mg, kemudian dilarutkan dalam 40 µl DMSO dan ditambahkan PBS sampai 400 µl sehingga diperoleh konsentrasi 5000 µM untuk senyawa 4-NFU dan 50000 µM untuk senyawa 5-FU. Selanjutnya, diencerkan menggunakan media kultur hingga diperoleh konsentrasi larutan uji akhir yang digunakan yaitu 0,5 µM; 5 µM; 50 µM; 250 µM; dan 500 µM untuk senyawa 4-NFU sedangkan senyawa 5-FU yaitu 0,5 µM; 5 µM; 50 µM; 250 µM; 500 µM; dan 5000 µM. Konsentrasi DMSO pada larutan uji akhir tersebut tidak lebih dari 1%.

Uji aktivitas sitotoksik dengan metode MTT

Sel (5×10^3 sel/100 µl) didistribusikan ke dalam sumuran pada 96-well plate, kemudian diinkubasi bersama dengan larutan uji dan pembanding dengan berbagai seri konsentrasi sebanyak 100 µl selama 24 jam di dalam inkubator CO₂ 5%, 37 °C. Pada akhir inkubasi, masing-masing sumuran ditambahkan 100 µl larutan MTT 5 mg/mL. Reaksi dihentikan dengan penambahan stopper SDS 10% dalam 0,1N HCl setelah 6 jam, dan diinkubasi kembali pada suhu kamar dalam ruang gelap selama semalam. Intensitas ungu yang terbentuk diukur dengan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm. Data absorbansi yang diperoleh dikonversi ke dalam persen sel hidup dengan rumus sebagai berikut:

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

IC₅₀ dihitung dengan analisis probit [11]. Setelah itu, nilai IC₅₀ dianalisis statistik uji t tidak berpasangan dengan taraf kepercayaan 95% untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan antara senyawa uji dan pembanding, dimana perbedaan yang signifikan ditunjukkan dengan nilai probabilitas ($\alpha < 0,05$).

Uji pengamatan proliferasi sel (doubling time)

Sel (5×10^3 sel/100 µl) didistribusikan ke dalam sumuran pada 96-well plate dan diinkubasi selama 24 jam. Keesokan harinya, 100 µl larutan senyawa uji dan pembanding dengan konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀, dan $1\frac{1}{2}$ IC₅₀ dimasukkan ke dalam sumuran, kemudian diinkubasi kembali. Lama inkubasi berbeda-beda, mulai dari 24, 48, dan 72 jam. Pada akhir inkubasi, masing-masing sumuran ditambahkan 100 µl larutan MTT 5 mg/mL. Reaksi dihentikan dengan penambahan stopper SDS 10% dalam 0,1N HCl setelah 6 jam, kemudian diinkubasi pada suhu kamar dalam ruang gelap selama semalam. Absorbansi masing-masing sumuran dibaca dengan ELISA reader pada $\lambda=595$ nm, kemudian dikonversi ke dalam persen sel hidup untuk masing-masing seri konsentrasi dan kontrol pada tiap-tiap waktu inkubasi. Setelah itu, dibuat grafik antara waktu inkubasi vs log jumlah sel hidup. Nilai doubling time dapat diperoleh dengan cara memasukkan nilai log jumlah dua kali sel awal sebagai nilai y pada persamaan regresi linear antara waktu inkubasi vs log jumlah sel hidup [12].

Hasil Penelitian

Uji aktivitas sitotoksik dengan metode MTT

Hasil pengamatan uji sitotoksitas senyawa 4-NFU dan 5-FU terhadap sel kanker payudara MCF-7 dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai IC₅₀ senyawa 4-NFU dan 5-FU terhadap sel kanker payudara MCF-7

| Senyawa | IC ₅₀ (µM) | % RSD |
|---------|--------------------------------|-------|
| 4-NFU | 134,04 ± 15,393 ^a | 11,48 |
| 5-FU | 4211,51 ± 794,180 ^b | 18,86 |

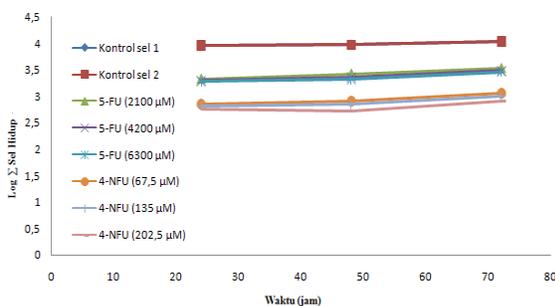
Data disajikan dalam rata-rata IC₅₀ ± SD (n=3)
Notasi huruf yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan yang nyata berdasarkan uji t dengan $\alpha=5\%$

Uji pengamatan proliferasi sel (doubling time)

Hasil uji doubling time senyawa 4-NFU dan 5-FU dengan metode MTT disajikan pada Tabel 2 sedangkan kurva kinetika proliferasinya dapat dilihat pada Gambar 2.

Tabel 2. Hasil uji *doubling time* senyawa 4-NFU dan 5-FU dengan metode MTT

| Senyawa | Konsentrasi (µM) | <i>Doubling time</i> (jam) |
|---------------|-----------------------------|----------------------------|
| 4-NFU | ½ IC ₅₀ = 67,5 | 290,51 |
| | IC ₅₀ = 135 | 350,97 |
| | 1½ IC ₅₀ = 202,5 | 418,2 |
| Kontrol sel 1 | - | 53,86 |
| 5-FU | ½ IC ₅₀ = 2100 | 185,99 |
| | IC ₅₀ = 4200 | 214 |
| | 1½ IC ₅₀ = 6300 | 220,63 |
| Kontrol sel 2 | - | 53,94 |



Gambar 2. Kurva kinetika proliferasi senyawa 4-NFU dan 5-FU

Pembahasan

Uji sitotoksitas dalam penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi ketoksikan senyawa 4-NFU terhadap sel kanker payudara MCF-7. Parameter uji sitotoksitas adalah nilai IC₅₀. IC₅₀ merupakan konsentrasi yang dapat menyebabkan sel hidup sebanyak 50% dari populasi sel kanker dan diharapkan sisanya mati. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin tinggi potensi senyawa uji sebagai agen sitotoksik [13].

Berdasarkan Tabel 1 dapat dilihat bahwa senyawa 4-NFU memiliki nilai IC₅₀ yang lebih kecil daripada senyawa 5-FU sehingga dapat dikatakan bahwa senyawa 4-NFU memiliki aktivitas sitotoksitas yang lebih baik daripada senyawa 5-FU. Hal tersebut dapat disebabkan karena pada senyawa 4-NFU terdapat peningkatan sifat lipofilitas, elektronik, dan sterik. Peningkatan lipofilitas terjadi karena adanya gugus nonpolar yaitu cincin aromatis sehingga mempengaruhi proses transpor pasif antar kompartemen berdasarkan koefisien partisi lemak/air. Adanya gugus nitro dan ester sebagai substituen dapat meningkatkan efek elektronik dari senyawa 4-NFU, dimana efek

elektronik tersebut dapat mempengaruhi ionisasi senyawa 4-NFU sehingga berdampak pada mudahnya senyawa 4-NFU melewati membran dan kuatnya ikatan antara senyawa 4-NFU dengan reseptor. Selain itu, posisi para pada benzoil dapat meningkatkan halangan sterik yang berhubungan dengan kesesuaian ikatan senyawa 4-NFU dengan reseptor [14].

Berdasarkan nilai IC₅₀ senyawa 4-NFU dan 5-FU, diperoleh harga $\alpha = 0,012$ ($\alpha < 0,05$) setelah dianalisis statistik uji t tidak berpasangan sehingga dapat dikatakan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara nilai IC₅₀ senyawa 4-NFU dan 5-FU. Selain itu, apabila dibandingkan dengan turunan 5-FU yang lain yaitu 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dengan IC₅₀ = 215,978 µM, senyawa 4-NFU masih memiliki aktivitas sitotoksitas yang lebih baik. Hal tersebut disebabkan karena adanya gugus halogen pada posisi para dapat menyulitkan proses metabolisme dari senyawa 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil untuk menjadi metabolit aktifnya sehingga dapat menurunkan aktivitas sitotoksitasnya [15].

Uji proliferasi dalam penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan senyawa 4-NFU dalam menghambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7. Parameter uji proliferasi adalah *doubling time*. *Doubling time* merupakan waktu yang diperlukan oleh sel untuk menggandakan dirinya menjadi dua kali lipatnya [13].

Berdasarkan Tabel 2 dapat dilihat bahwa kontrol sel memiliki nilai *doubling time* tercepat. Hal ini menunjukkan bahwa kecepatan proliferasi sel dapat diperlambat dengan pemberian senyawa 4-NFU dan 5-FU, dimana senyawa 4-NFU menunjukkan penghambatan terhadap proliferasi sel kanker payudara MCF-7 yang lebih besar daripada senyawa 5-FU karena nilai *doubling time* sel setelah pemberian senyawa 4-NFU lebih besar daripada setelah pemberian senyawa 5-FU. Selain itu, semakin tinggi konsentrasi senyawa 4-NFU dan 5-FU maka semakin besar kemampuan senyawa tersebut dalam menghambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7 yang ditunjukkan dengan nilai *doubling time* yang semakin lama.

Kemampuan penghambatan proliferasi sel dapat dikaitkan dengan mekanisme *cell cycle arrest* yaitu adanya kerusakan DNA atau RNA akan memicu aktivasi gen p53 sehingga siklus sel akan terhenti sementara untuk proses perbaikan DNA atau RNA tersebut. Apabila kerusakannya cukup parah dan tidak bisa diperbaiki maka sel akan mengalami apoptosis

atau bunuh diri [16]. Namun, pada penelitian ini hanya dapat ditentukan jumlah sel yang hidup dan tidak dapat diketahui mekanisme molekuler terhadap penghambatan proliferasi sel kanker. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

Simpulan dan Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa senyawa 4-NFU memiliki aktivitas sitotoksisitas dan antiproliferasi yang lebih baik terhadap sel kanker payudara MCF-7 daripada senyawa 5-FU.

Beberapa saran yang dapat dilakukan peneliti selanjutnya adalah uji lebih lanjut terhadap mekanisme molekuler terhadap penghambatan proliferasi sel kanker yaitu berupa uji apoptosis untuk mengetahui adanya kematian sel kanker dan uji untuk mendeteksi adanya ekspresi protein proapoptosis yang memperlancar mekanisme tersebut.

Daftar Pustaka

- [1] Hanahan D & Weinberg RA. Hallmark of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 100: 57-70.
- [2] IARC (International Agency for Research on Cancer). Latest world cancer statistics. UK: World Health Organization; 2013.
- [3] American Cancer Society. Breast cancer: facts and figures 2013-2014. Atlanta: American Cancer Society, Inc.; 2013.
- [4] Nafrialdi & Gan S. 2012. Farmakologi dan terapi. Edisi V. Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2012.
- [5] Zhang N, Yin Y, Xu SJ, & Chen WS. 5-fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules*. 2008; 18: 1551-1569.
- [6] Kurnia NDM. Sintesis 1-(4-nitrobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil sebagai upaya pengembangan obat antikanker. Skripsi. Jember: Program Sarjana Fakultas Farmasi Universitas Jember; 2012.
- [7] 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.
- [8] Pfeiffer TJ. Phytoestrogens may inhibit proliferation of MCF-7 cells, an estrogen-responsive breast adenocarcinoma cell line. Tesis. Worcester: Worcester Polytechnic Institute; 2004.
- [9] Foster JS, Henley DC, Ahamed S, & Wimalasena J. Estrogens and cell-cycle regulation in breast cancer. *Trends Endocrin Met*. 2001; 7(12): 320-327.
- [10] Doyle A & Griffiths JB. Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1998.
- [11] Sinaga E, Suprihatin, & Wiryanti I. Perbandingan daya sitotoksik ekstrak rimpang 3 jenis tumbuhan zingiberaceae terhadap sel kanker MCF-7. *JFI*. 2011; 5(3): 125-133.
- [12] Meiyanto E, Susidarti RA, Handayani S, & Rahmi F. Ekstrak etanol biji buah pinang (*Areca catechu* L.) mampu menghambat proliferasi dan memacu apoptosis sel MCF-7. *MFI*. 2008; 19(1): 12-19.
- [13] Nurani LH. Uji sitotoksisitas dan antiproliferasi fraksi etil asetat ekstrak etanol biji jinten hitam (*Nigella sativa*, Lour) terhadap sel mieloma. *Farmasains*. 2011; 2(1): 11-21.
- [14] Siswandono & Soekardjo B. Kimia medisinal jilid 1. Edisi Kedua. Surabaya: Airlangga University Press; 2008.
- [15] Puspaningtyas AY. Modifikasi struktur 5-FU dan uji sitotoksik turunan 1-(benzoiloksimetil)-5-fluorourasil hasil modifikasi terhadap sel kanker payudara MCF-7 (sebagai upaya pengembangan obat antikanker). Tesis. Surabaya: Program Studi Magister Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga; 2011.
- [16] Siu WY, Yam CH, & Poon RYC. G1 versus G2 cell cycle arrest after adriamycin-induced damage in mouse swiss3T3 cells. *FEBS Letters*. 1999; 461: 299-305.