

**UJI SITOTOKSITAS DAN HAMBATAN EKSPRESI VEGF pada SEL 4T1 MINYAK
ATSIRI RIMPANG *Curcuma mangga* Val.****(CYTOTOXICITY AND VEGF - EXPRESSION INHIBITION TESTS OF *C. mangga* Val.
ESSENTIAL OIL ON 4T1 CELLS)****Nurul Mukhlisa^{1*}, Retno S. Sudibyo², dan Retno Murwanti²**¹Magister Ilmu Farmasi, Universitas Gadjah Mada²Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

Jl. Sekip Utara, Senolowo, Sinduadi, Mlati, Sleman, Indonesia - 55281

*email: nurul.mukhlisa@mail.ugm.ac.id

Abstrak

TNBC (*Triple Negative Breast Cancer*) merupakan kanker payudara yang paling ganas dengan resiko kambuh dan metastasis yang tinggi. Terapi yang efektif untuk pasien TNBC adalah menggunakan kemoterapi, namun banyak pasien mengalami *drug resistant* yang dapat meningkatkan mortalitas. TNBC bersifat metastasis ke organ tubuh lain yang ditandai dengan terjadinya angiogenesis. VEGF merupakan salah satu faktor angiogenik sehingga studi hambatan ekspresi protein tersebut dapat digunakan sebagai target pengembangan obat anti TNBC. Rimpang *Curcuma mangga* Val. digunakan masyarakat Yogyakarta sebagai herbal antikanker payudara, dan minyak atsirinya bersifat sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dan MCF-7; namun belum terbukti sitotoksik terhadap sel TNBC. Penelitian ini bertujuan untuk melihat potensi antikanker TNBC minyak atsiri rimpang *C. mangga* Val. melalui uji sitotoksitasnya terhadap sel 4T1 dengan kontrol positif alpelisib dan penghambatannya pada ekspresi protein VEGF. Hasil penelitian menunjukkan IC₅₀ alpelisib terhadap sel kanker 4T1 adalah 32,975 µg/ml; sedangkan IC₅₀ minyak atrisi *C. mangga* Val. adalah 91,96 µg/ml. Tidak ada perbedaan signifikan aktivitas penghambatan ekspresi protein VEGF antara minyak atsiri *C. mangga* Val dan alpelisib. Dapat disimpulkan bahwa minyak atsiri *C. mangga* Val. memiliki potensi antikanker payudara *triple negative*.

Kata kunci: Curcuma mangga Val., Triple Negative Breast Cancer, VEGF, 4T1

Abstract

TNBC (*Triple Negative Breast Cancer*) is the most malignant of breast cancer with high risk of recurrence and metastasis. The most effective therapy for TNBC patients is chemotherapy. However, many patients experienced with the drug resistant which increases of the mortality risk. TNBC is metastatic to other organs with indicated by angiogenesis process. VEGF is an angiogenic-factor-protein, so inhibition of its expression can be used as a target for anti-TNBC drug development. *Curcuma mangga* Val. rhizomes are widely used in Yogyakarta as an herbal anti-breast cancer. Research showed that the essential oil of *C. mangga* Val. had cytotoxic activity on T47D and MCF7 cells. However, there is no cytotoxic activity research on TNBC yet. This study is to determine the TNBC-anticancer potency of *C. mangga* Val. essential oil through its cytotoxic activity towards 4T1-breast cancer cells with alpelisib as the positive control, and its inhibition of VEGF-protein expression. The results showed the alpelisib's IC₅₀ was 32.975 µg/ml; while *C. mangga* Val. oil's IC₅₀ was 91,96 µg/ml against 4T1-breast cancer cells. There was no significantly different of VEGF-expression inhibition between *C. mangga* Val. oil and alpelisib. It could be concluded that *C. mangga* Val. essential oil at a potency of anti-triple negative breast cancer.

Keywords: Curcuma mangga Val., Triple Negative Breast Cancer, VEGF, 4T1

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan salah satu penyebab kematian utama di dunia. Indonesia berada pada posisi pertama di Asia Tenggara dengan jumlah kasus sebanyak 86.940 dan 20% merupakan kanker payudara subtype *triple negative breast cancer* (TNBC) (Khandelwal *et al.*, 2018). TNBC merupakan kanker payudara yang tidak mengekspresikan hormon estrogen, progesteron, dan HER 2 sehingga pengobatan TNBC tidak efektif bila menargetkan pada hormon tersebut (Bauer *et al.*, 2007). Kemoterapi merupakan terapi paling efektif untuk pasien TNBC. Namun, selain efek samping yang tidak mengenakkan, banyak pasien yang mengalami *drug resistant* yang kemudian menyebabkan peningkatan mortalitas (Bianchini, *et al.*, 2016; Lehmann *et al.*, 2011; Anders *et al.*, 2009).

TNBC memiliki kemampuan menyebar ke organ-organ tubuh yang lain dengan ditandai pertumbuhan darah baru (angiogenesis) melalui pengaturan VEGF (Liu, *et al.*, 2013; Parveen *et al.*, 2016; Ribatti *et al.*, 2016). Ekspresi VEGF dimodulasi oleh *Hepatocyte growth factor* (HGF) yang memainkan peran penting dalam proses angiogenesis. C-Met yang aktif mampu mengaktifkan jalur PI3K dan jalur AKt. Hal ini dapat memicu terjadinya transkripsi gen VEGF (Yan & Boyd, 2007). Beberapa tahun terakhir, banyak obat-obatan baru seperti

alpelisib yang dikembangkan untuk menghambat jalur PI3K-Akt sehingga mampu menghambat perkembangan TNBC melalui proses angiogenik (Verret *et al.*, 2019). Pengembangan obat-obatan penghambat proses angiogenik melalui jalur PI3K/Akt diharapkan efektif untuk pasien TNBC.

Rimpang *C. mangga* Val. secara empirik banyak digunakan masyarakat Yogyakarta sebagai obat antikanker, utamanya kanker payudara (Khasanah, 2002; Verlianara, 2004). Minyak atsiri *C. mangga* Val. mempunyai aktivitas sitotoksik pada kanker payudara T47D dan MCF-7 secara *in vitro* (Astuti, 2015; Sudiby & Taryono, 2020) dan secara *in silico* (Sudiby dkk., 2021). Minyak atsiri rimpang *C. mangga* Val. memiliki kemampuan dalam penurunan ekspresi H-Ras (Astuti, 2015). Penghambatan ekspresi H-Ras menghambat terjadinya angiogenesis lewat pengaturan VEGF (Chambell & Der, 2004). Walaupun demikian, belum ada penelitian secara *in vitro* yang menunjukkan bahwa minyak atsiri *C. mangga* Val. mempunyai aktivitas sitotoksik pada sel kanker payudara TNBC. Hasil penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa minyak atsiri *C. mangga* Val. memiliki aktivitas antikanker pada sel kanker payudara *triple negative* melalui uji sitotoksitas pada sel 4T1, dan melalui kemampuannya pada penghambatan ekspresi VEGF (penghambatan angiogenesis) secara imunositokimia (*in vitro*).

METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diawali dengan pembuatan minyak atsiri yang berasal dari rimpang *Curcuma mangga* Val. diperoleh dari Bantul, Yogyakarta. Bahan untuk uji sitotoksitas adalah sel 4T1 (koleksi Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta), alpelisib (TargetMol, Shanghai, China), Media Kultur RPMI (Sigma), *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Sigma), *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide* (MTT) (Sigma), dan *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) (Merck), HCL (Merck). Bahan untuk uji penghambatan ekspresi VEGF adalah media kultur RPMI, PBS, metanol, akuades, larutan hidrogen peroksida, antibodi monoklonal primer, antibodi sekunder, reagen kompleks streptavidin-enzim peroksidase, larutan substrat kromogen DAB, larutan *Mae Haematoxylin*, larutan ksilol, dan alkohol.

Metode yang dilakukan adalah sebagai berikut. Minyak atsiri *C. mangga* Val. didapat dari destilasi uap irisan tipis rimpang selama 7 jam. Minyak dikeringkan melalui pengocokan dengan natrium sulfat anhidrat.

Sel dikultur dalam media RPMI yang ditambahkan dengan 10% FBS, 150 UI/mL penicillin dan 150µg/mL streptomisin. Sel yang dikultur ditumbuhkan dalam inkubator CO₂ pada 37°C.

Sel 4T1 yang telah 80% konfluen dipanen dan ditanam pada *96-wellplate* sebanyak 10⁴ sel/sumuran. Masing-masing sumuran ditambahkan secara triplo seri kadar larutan minyak atsiri *C. mangga* Val. dalam media kultur adalah 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, dan 60 µg/ml; dan seri kadar alpelisib adalah 50, 45, 40, 35, 30, 25, dan 20 µg/ml. Kultur diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂, kemudian media dibuang dan sel dicuci menggunakan PBS. Dalam PBS, 5mg/ml MTT diencerkan menggunakan media RPMI dan 100 µl reagen MTT ditambahkan ke dalam setiap sumuran. Setelah diinkubasi selama 3 jam, reaksi dihentikan dengan menggunakan penambahan 100 µl SDS 10% dalam HCL 0,01 N dan diinkubasi semalam pada suhu ruangan dalam tempat yang gelap. Absorbansi diukur menggunakan *microplate reader* pada λ595 nm. Absorban yang diperoleh dibuat kurva regresi untuk menghitung IC₅₀ (Doyle & Griffiths, 2000).

Imunositokimia penghambatan ekspresi VEGF. Sel 4T1 sebanyak 10⁵ ditanam pada *24-wellplate* yang telah diberi *cover slip*. Setelah inkubasi selama 24 jam, semua media kultur dibuang secara perlahan-lahan, kemudian dicuci menggunakan PBS, lalu diberikan perlakuan minyak atsiri *C. mangga* Val. dan alpelisib dengan menggunakan masing-masing konsentrasi IC₅₀ yang telah diketahui. Setelah inkubasi selama 24 jam,

semua media dari sumuran dibuang dan dicuci menggunakan 500 μ l PBS. Setelah fiksasi dengan 300 μ l methanol pada *cover slip*, media diinkubasi selama 10 menit dalam *freezer*. *Cover slip* ditetesi larutan hidrogen peroksida dan diinkubasi selama 10 menit, lalu *cover slip* ditetesi antibodi monoklonal primer dan diinkubasi selama 5 menit. Inkubasi kembali dilakukan selama 10 menit setelah *cover slip* ditetesi antibodi sekunder. Reagen kompleks streptavidin-enzim peroksidase ditetaskan dan diinkubasi selama 10 menit. Selanjutnya, larutan substrat kromogen DAB ditetaskan dan diinkubasi 10 menit.

Larutan *Mae Haematoxylin* ditetaskan dan diinkubasi selama 3 menit, kemudian *cover slip* dicelupkan ke dalam larutan ksilol dan alkohol. Setelah *Cover slip* kering diletakkan di atas *object glass* dan ditetesi media perekat, kemudian *cover slip* ditutup dengan kotak kaca dan diamati ekspresi protein dalam sel dengan mikroskop cahaya (Graham, Jr. & Karnosky, 1966).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Sitotoksik. Hasil uji sitotoksitas minyak atsiri *C. mangga* Val. terhadap sel kanker 4T1 ditampilkan pada Gambar 1.

Morfologi sel 4T1 berbentuk daun dan lonjong dengan batas antarsel terlihat jelas dengan densitas sel yang tinggi dan saling bergerombol (membentuk koloni) dengan

konfluen kurang lebih 80% (Gambar 1-I). Pada perlakuan minyak atsiri *C. mangga* Val. sesuai kadar IC_{50} , terjadi perubahan morfologi sel 4T1, yaitu terjadi perubahan ukuran sel yang lebih kecil dan bentuk yang lebih bulat atau tidak beraturan, serta batas antar sel tidak terlihat jelas jika dibandingkan dengan kontrol sel (Gambar 1-II) (Hanahan & Weinberg, 2011).

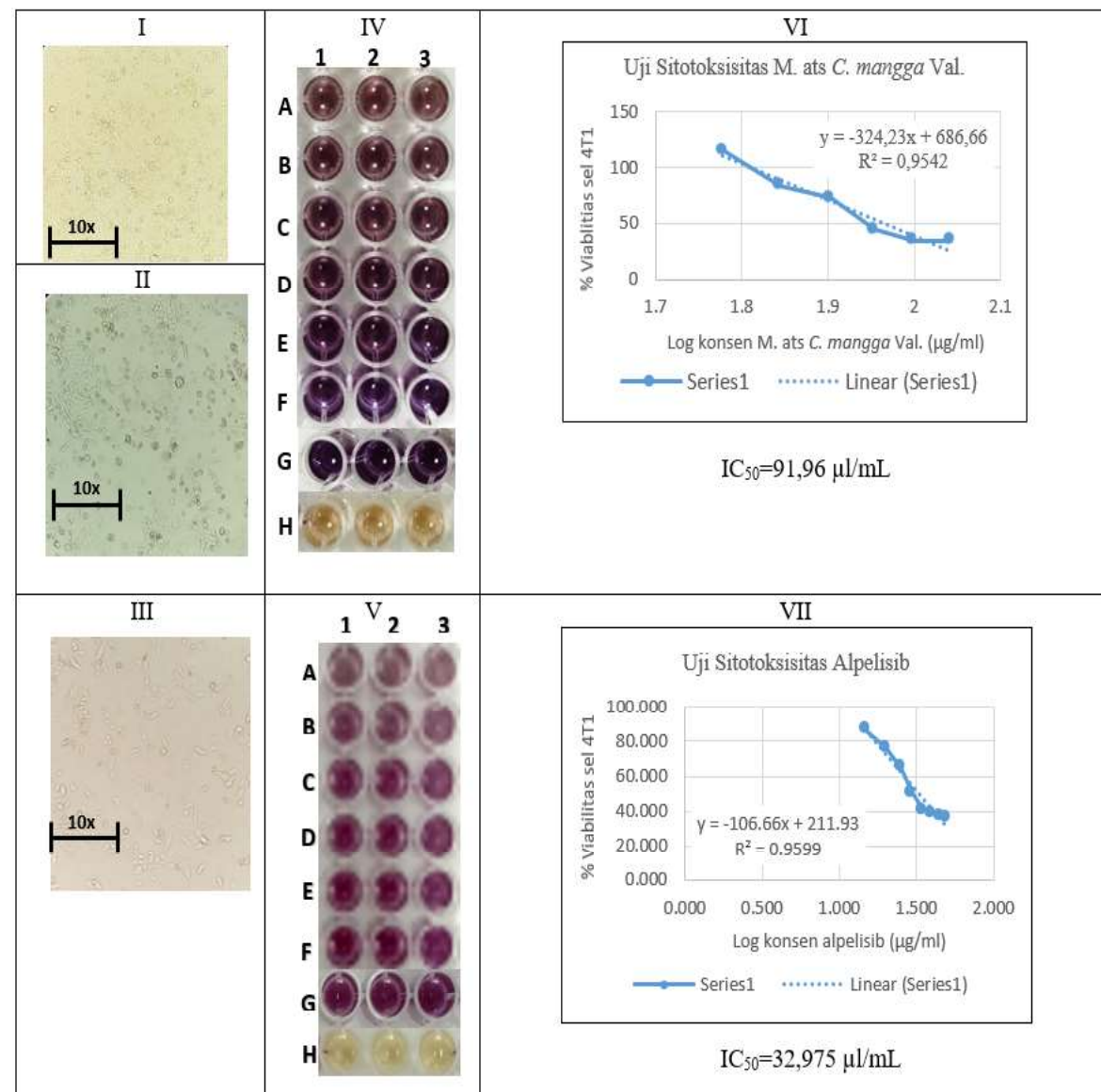
Uji sitotoksitas minyak atsiri *C. mangga* Val. terhadap sel kanker payudara 4T1 memberikan $IC_{50}=91,96$ μ g/ml (Gambar 1-II, IV dan VI). Hasil menunjukkan bahwa minyak atsiri *C. mangga* Val. memiliki bersifat sitotoksik terhadap 4T1, karena menurut Skehan *et al.* (1990) suatu senyawa bersifat sitotoksik jika memiliki nilai $IC_{50}\leq 100$ μ g/ml (Zampieri *et al.*, 2002). Uji sitotoksitas alpelisib (kontrol positif) pada sel 4T1 lebih cenderung menunjukkan sifat sitotoksik antikanker dibanding minyak atsiri *C. mangga* Val. dengan nilai $IC_{50}=32,975$ μ g/ml (Gambar 1-III, V, dan VII).

Uji imunositokimia dilakukan untuk mengetahui keefektifan kandungan zat aktif antikanker minyak atsiri *C. mangga* Val. dalam menghambat ekspresi protein VEGF yang berperan pada proses angiogenesis; dengan pembandingan alpelisib. Hasil penghambatan ekspresi protein VEGF terlihat pada Gambar 2.

Pemeriksaan kualitatif penghambatan ditunjukkan dengan adanya warna biru

Gambar 1

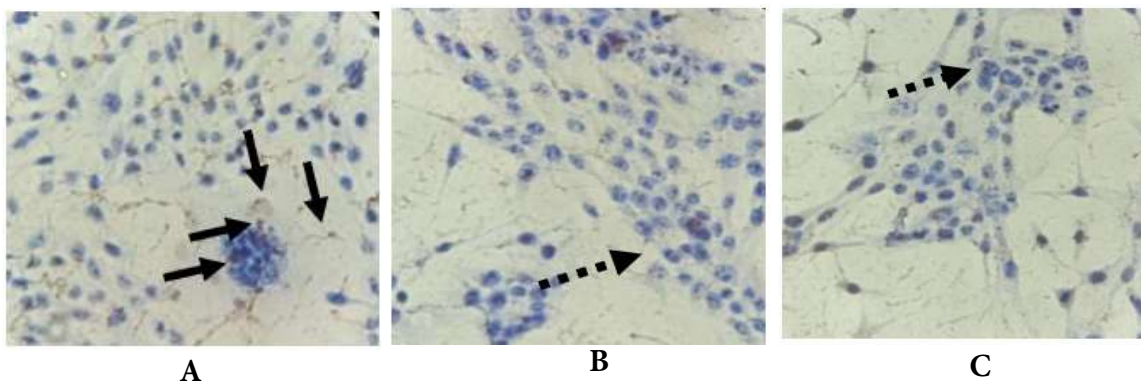
Uji Sitotoksitas Minyak Atsiri *C. mangga* Val. dan Alpelisib pada Sel 4T1



Keterangan: (I) Sel 4T1 tanpa perlakuan (kontrol sel), (II) Sel 4T1 dengan perlakuan minyak atsiri *C. mangga* Val. (100 µl/mL), (III) Sel 4T1 dengan perlakuan alpelisib (40 µl/mL), (IV) A-F (triplo 1,2,3) perlakuan minyak atsiri *C. mangga* Val. dengan konsentrasi 120, 110, 100, 90, 80, 70 µl/ml ; G1-G3: kontrol sel; H1-H3: kontrol media (V) A-F (triplo 1,2,3) perlakuan alpelisib dengan konsentrasi 50, 45, 40, 35, 30, 25 µl/ml; G1-G3: kontrol sel; H1-H3: kontrol media; (VI) kurva regresi sitotoksitas minyak atsiri *C. mangga* Val. pada sel 4T1; $R^2=0,9542$ dan $IC_{50}=91,95$ µl/ml dan (VII) kurva regresi sitotoksitas alpelisib pada sel 4T1; $R^2=0,9599$ dan $IC_{50}=32,98$ µl/ml.

Gambar 2

Penghambatan Ekspresi Protein VEGF oleh Minyak Atsiri *C. mangga* Val. dan Alpelisib pada Sel 4T1



Keterangan: (A) Kontrol sel; (B) Kelompok perlakuan minyak atsiri *C. mangga* Val.; (C) Kelompok perlakuan alpelisib. Tanda \rightarrow = tidak ada penghambatan; tanda $--\rightarrow$ = ada penghambatan. Pengamatan di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x.

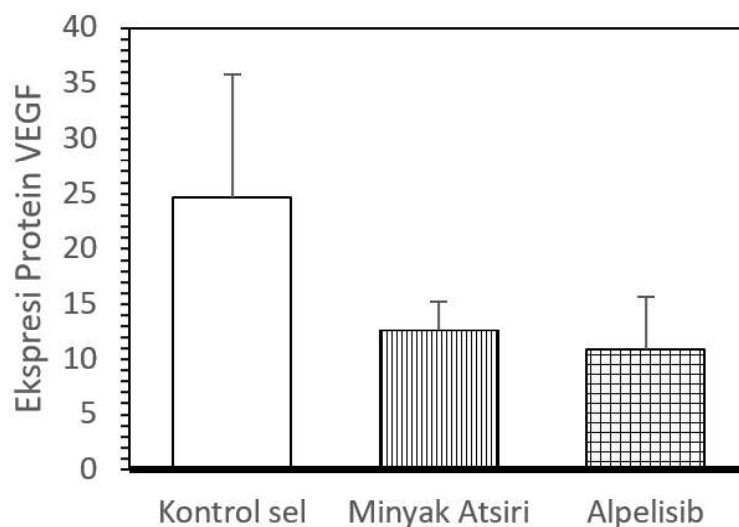
keunguan (Gambar 2B dan C) dan tidak adanya penghambatan ditunjukkan dengan adanya warna coklat keemasan di sekitar sel (Gambar 2A). Warna coklat keemasan menunjukkan bahwa sel tersebut mengekspresikan protein VEGF.

Hasil pemeriksaan kuantitatif melalui analisis statistik menunjukkan bahwa semua kelompok data (kontrol sel, alpelisib dan minyak atsiri *C. mangga* Val.) merupakan data normal dan homogen ($p > 0,05$). Hasil analisis dengan *one way* ANOVA diperoleh nilai signifikansi 0,0001 ($p < 0,05$). Hal tersebut menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antarkelompok. Hasil uji *Tukey* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol terhadap kelompok perlakuan minyak atsiri

dan alpelisib. Uji statistik menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok minyak atsiri dan alpelisib. Hal ini menandakan bahwa minyak atsiri *C. mangga* Val. memiliki efek penghambatan ekspresi protein yang sama dengan alpelisib (Gambar 3).

Dari hasil penelitian imunositokimia di atas dapat disimpulkan bahwa minyak atsiri *C. mangga* Val. mampu menghambat ekspresi VEGF sel 4T1. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian *molecular docking* yang dilakukan oleh Sudiby (2021) yang menyatakan bahwa kandungan senyawa minyak atsiri *C. mangga* Val.: *m-camphorene*, *nerolidol*, dan *p-camphotene* (dengan *dockingscore*: -6,8037, -6,6189, dan -6,6-33) yang berpotensi sebagai inhibitor

Gambar 3
Efek Penghambatan Ekspresi VEGF oleh Minyak Atsiri *C. mangga* Val. dan Alpelisib pada Sel 4T1 (n=4)



Keterangan: Alpelisib dan minyak atsiri menghambat secara signifikan ekspresi VEGF ($p < 0.05$).

pada reseptor VEGF: PI3K (PDB-4TV3); serta *p*-camphorene dan *m*-camphorene (dengan *docking score*: -7,5403 dan -7,3554) pada reseptor Akt (PDB-2UW9). Sedangkan sebagai ligan pembanding adalah obat antikanker payudara TNBC, alpelisib dengan *docking score* -8,4847 pada reseptor PI3K (PDB – 4TV3) dan *docking score* alpelisib -7,6162 pada reseptor Akt (PDB-2UW9).

SIMPULAN

Minyak atsiri *C. mangga* Val. memiliki aktivitas sitotoksik pada sel 4T1 dengan $IC_{50} = 91,96 \mu\text{l/ml}$. Efek penghambatan ekspresi protein VEGF pada sel 4T1 oleh minyak atsiri *C. mangga* Val. sama secara

signifikan dengan efek dari alpelisib. Dapat disimpulkan bahwa minyak atsiri *C. mangga* Val. memiliki potensi antikanker payudara *triple negative* melalui penghambatan angiogenik.

DAFTAR PUSTAKA

- Anders, C. K., & Carey, L. A. (2009). Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 9, S73-S81.
- Astuti, E. (2015). *Selektivitas dan mekanisme molekuler antikanker ekstrak aktif rimpang Curcuma mangga Val.* (Disertasi tidak diterbitkan). Universitas Gadjah Mada.
- Bauer, K. R., Brown, M., Cress, R. D., Parise, C. A., & Caggiano, V. (2007).

- Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: A population-based study from the California Cancer Registry. *Cancer*, *109*(9), 1721-1728.
- Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E., & Gianni, L. (2016). Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *13*(11), 674-690. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.66.
- Campbell, P. M., & Der, C. J. (2004). Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. Dalam *Seminars in cancer biology*, *14*(2), 105-114.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674.
- Khandelwal, S., Boylan, M., Spallholz, J. E., & Gollahon, L. (2018). Cytotoxicity of selenium immunoconjugates against triple negative breast cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(11), 3352.
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*, *121*(7), 2750-2767. doi: 10.1172/JCI45014.
- Liu, Y., Zhao, L., Li, D., Yin, Y., Zhang, C. Y., Li, J., & Zhang, Y. (2013). Microvesicle-delivery miR-150 promotes tumorigenesis by up-regulating VEGF, and the neutralization of miR-150 attenuate tumor development. *Protein & Cell*, *4*(12), 932-941.
- Parveen, A., Akash, M. S. H., Rehman, K., & Kyunn, W. W. (2016). Dual role of p21 in the progression of cancer and its treatment. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, *26*(1), 49-61. doi: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.v26.i1.60.
- Ribatti, D., Nico, B., Ruggieri, S., Tamma, R., Simone, G., & Mangia, A. (2016). Angiogenesis and antiangiogenesis in triple-negative breast cancer. *Translational Oncology*, *9*(5), 453-457.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., & Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *82*(13), 1107-1112.
- Sudiby R. S. (2021). *Uji sitotoksitas dan molecular docking antikanker payudara jalur Era dan VEGF kandungan senyawa ekstrak heksan dan minyak atsiri rimpang Curcuma mangga Val.* (Laporan penelitian tidak diterbitkan). Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.
- Sudiby, R. S., Sudarmanto, A., Mahdi, L., & Khudzifi, M. (2020). Pharmacophore mapping and molecular docking analysis of essential oil compounds from *Curcuma mangga* Val. rhizome against α , and the cytotoxic effect on MCF 7 Cells. *Indonesian Journal of Pharmacy* (Reviewed, 2021).
- Sudiby, R. S., & Taryono. (2020). Increasing anticancer substances and the cytotoxicity test on T47D using fertilization and induction on *Curcuma mango* Val. *Jurnal Penelitian Saintek* *25*(1), 1-10.
- Verret, B., Cortes, J., Bachelot, T., Andre, F., & Arnedos, M. (2019). Efficacy of PI3K inhibitors in advanced breast cancer. *Annals of Oncology*, *30*, x12-x20.

Yan, C., & Boyd, D. D. (2007). Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *Journal of Cellular Physiology*, 211(1), 19-26.

Zampieri, L., Bianchi, P., Ruff, P., & Arbuthnot, P. (2002). Differential

modulation by estradiol of P-glycoprotein drug resistance protein expression in cultured MCF7 and T47D breast cancer cells. *Anticancer Research*, 22(4), 2253-2259.