

## AKTIVITAS SITOTOKSIK DAN ANTIPROLIFERATIF SENYAWA DERIVAT XANTON SERTA PENGARUHNYA TERHADAP EKSPRESI mRNA COX-2, VEGF, DAN VEGFR2 PADA SEL KANKER KOLOREKTAL

Isnatin Miladiyah<sup>1,2</sup>, Emmy Yuanita<sup>3</sup>, Jumina Jumina<sup>4</sup>, Sofia Mubarika Haryana<sup>5</sup>,  
Mustofa Mustofa<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta

<sup>2</sup> Program Doktor Ilmu Kedokteran dan Kesehatan, Fakultas Kedokteran,  
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>3</sup> Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA),  
Universitas Mataram, Mataram

<sup>4</sup> Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA),  
Gadjah Mada University, Yogyakarta

<sup>5</sup> Departemen Histologi dan Biologi Sel, Fakultas Kedokteran,  
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>6</sup> Departemen Farmakologi dan Terapi, Fakultas Kedokteran,  
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Email: [isnatin@uii.ac.id](mailto:isnatin@uii.ac.id)

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik dan antiproliferatif senyawa derivat xanton yaitu 3,4,6-trihidroksixanton (3,4,6-THX) terhadap sel kanker kolorektal WiDR serta pengaruhnya terhadap ekspresi mRNA COX-2, VEGF, dan VEGFR-2 yang berperan penting dalam proses metastasis sel kanker. Uji sitotoksik dan antiproliferatif dilakukan dengan metode 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromida (MTT) assay, sedangkan tingkat ekspresi mRNA COX-2, VEGF, dan VEGFR-2 diuji menggunakan metode quantitative real time-polymerase chain reaction (qRT-PCR) dengan primer yang sesuai. Hasil uji sitotoksik menunjukkan bahwa senyawa 3,4,6-THX bersifat sitotoksik sedang, dengan nilai penghambatan (inhibitory concentration 50% atau IC<sub>50</sub>) sebesar 9,23 µg/mL, dan aktivitas antiproliferatif dimulai pada konsentrasi setara dengan 1 x IC<sub>50</sub>. Pada peningkatan konsentrasi (2 x IC<sub>50</sub>), aktivitas antiproliferatif tidak meningkat/tetap. Pengujian dengan qRT-PCR menunjukkan bahwa pemberian senyawa xanton dengan konsentrasi 1 x IC<sub>50</sub> mampu menekan ekspresi mRNA COX-2 sebesar 37%, namun tidak menghambat ekspresi VEGF dan VEGFR-2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa 3,4,6-THX bersifat antikanker melalui penghambatan terhadap kerja enzim COX-2, yang berperan penting dalam proses inflamasi kronis pada patologi kanker.

Kata kunci: xanton sintesis; aktivitas antikanker; COX-2; VEGF; VEGFR-2

### ABSTRACT

This study is aimed to determine the cytotoxic and antiproliferative activity of xanthone derivative compound (3,4,6-trihydroxyxantone/3,4,6-THX) against colorectal cancer cell WiDR and its effect on COX-2, VEGF, and VEGFR-2 mRNA expression, that play an important role in the process of cancer cell metastasis. Cytotoxic and antiproliferative tests were performed by 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay method, while COX-2, VEGF, and VEGFR-2 expression mRNA levels were tested by using the quantitative real time-polymerase chain reaction (qRT-PCR) with a suitable primer. The results of the cytotoxic test showed that the compound 3,4,6-THX was moderately cytotoxic, with an inhibitory concentration of 50% or IC<sub>50</sub> value of 9.23 µg / mL, and antiproliferative activity was initiated at concentrations equal to 1 × IC<sub>50</sub>. At increased concentration (2 × IC<sub>50</sub>). The antiproliferative activity did not increase proportionately with concentration. Tests with qRT-PCR showed that administration of xanthone compound with 1 × IC<sub>50</sub> concentration suppressed COX-2 mRNA expression by 37%, but did not inhibit VEGF and VEGFR-2 expression. The results showed that the compound 3,4,6-THX served as an anticancer agent by inhibition of COX-2 enzyme activity, which play an important role in the chronic inflammatory process in cancer pathology.

*Keywords: Synthetic xanthone; anticancer activity; COX-2; VEGF; VEGFR-2*

## **PENDAHULUAN**

Saat ini kanker merupakan penyebab kematian utama di negara maju sedangkan di negara berkembang menempati urutan kedua. Data *International Agency for Research on Cancer* (IARC) tahun 2008 menunjukkan bahwa terdapat 12,7 juta kasus kanker baru dengan jumlah kematian 7,6 juta (Ferlay *et al.*, 2010), sedangkan pada tahun 2012 ditemukan 14,1 juta kasus kanker baru dengan 8,2 juta kematian (IARC, 2013). Proyeksi insidensi global kejadian seluruh jenis kanker pada tahun 2020 adalah sebesar 15,5 juta kasus (Mathers & Loncar, 2006) dan pada tahun 2030 sebanyak 22,2 juta (Bray *et al.*, 2012).

Kemoterapi masih menjadi modalitas utama dalam terapi kanker selama beberapa dekade terakhir. Meskipun demikian, tingkat keberhasilan kemoterapi masih rendah karena timbulnya efek samping dan resistensi sel kanker akibat sifat kerja antikanker yang tidak selektif dan tidak spesifik. Oleh karena itu, saat ini pengembangan antikanker baru diarahkan pada upaya mendapatkan antikanker yang bekerja secara selektif dan spesifik, yang ditujukan terhadap abnormalitas genomik dan molekuler (Workman *et al.*, 2013).

Pengembangan obat baru melalui sintesis secara kimiawi merupakan salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mendorong kemandirian obat di Indonesia. Hal ini sesuai strategi pemerintah dalam meningkatkan ketahanan pangan dan obat Indonesia (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia [Kemenkes RI], 2013), sehingga diharapkan dengan sintesis kimia senyawa baru akan dapat meningkatkan kemandirian dalam produksi obat, khususnya untuk obat antikanker. Dengan demikian, proses sintesis senyawa baru turunan xanton dan pengujian potensi sitotoksiknya ini sangat relevan dengan tujuan besar negara Indonesia dalam penguatan ketahanan pangan dan obat.

Senyawa turunan xanton adalah salah satu senyawa yang cukup menjanjikan untuk dikembangkan sebagai salah satu alternatif antikanker tersebut. Xanton merupakan senyawa fenolat alami yang telah lama dikenal sebagai antioksidan, karena aktivitasnya sebagai kelator logam, peredam radikal bebas, dan penghambat peroksidasi lipid (Pinto *et al.*, 2005). Meskipun potensial, namun senyawa alam jumlahnya terbatas sehingga ketersediaannya tidak bisa terjamin. Oleh karena itu, perlu dikembangkan senyawa sintesis yang akan menjamin ketersediaan dan keberlangsungan produksinya, karena dapat dibuat kembali dalam jumlah besar.

Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa senyawa xanton dari alam terbukti berefek terhadap peningkatan apoptosis dan hambatan siklus sel, dengan memacu berbagai enzim caspase (Kuete et al., 2014), peningkatan protein Bax, hambatan terhadap Bcl-2 dan NF- $\kappa$ B (Mohan et al., 2012), serta hambatan terhadap berbagai siklin (Kuete et al., 2014). Penelitian lain menunjukkan bahwa kelainan apoptosis dan siklus sel akibat deregulasi p53, Bcl-2, NF- $\kappa$ B, dan berbagai caspase berkaitan dengan kelainan dalam fungsi COX-2 dan VEGF (Rajasekaran *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2014).

Peran COX-2 dalam karsinogenesis melibatkan beberapa hal. Peningkatan ekspresi COX-2 menyebabkan adhesi sel epitel intestinal tikus ke matriks ekstraseluler meningkat (Dubois *et al.*, 1996), juga menyebabkan aktivasi matriks metaloproteinase-2 (MMP-2) pada sel kanker payudara Hs578T (Takahashi *et al.*, 1999) dan sel kanker kolon Caco-2 (Tsujii *et al.*, 1997), yang meningkatkan kemampuan sel kanker melakukan invasi dan metastasis. Adanya metastasis ini penting dalam perkembangan kanker, karena sebagian besar penderita kanker (90%) meninggal bukan karena kanker primernya, melainkan karena metastasis jauh (Harrington, 2011).

Peningkatan ekspresi VEGF dikaitkan dengan prognosis buruk, *survival* yang lebih singkat, dan peningkatan angka kekambuhan kanker (Stroescu *et al.*, 2008). Dalam hubungannya dengan faktor pertumbuhan lain, peningkatan VEGF berkorelasi erat dengan peningkatan ekspresi *nuclear factor kappa-B* (NF $\kappa$ B), COX-2, Bcl-2, penurunan caspase-3 dan caspase-9 (Rajasekaran *et al.*, 2013), serta penurunan p53 (Yu *et al.*, 2014). Karena angiogenesis terjadi bersamaan dengan *shedding* sel-sel neoplastik ke dalam sirkulasi dan metastasis, maka angiogenesis merupakan salah satu faktor prognostik untuk sejumlah tumor (Benazzi *et al.*, 2014) dan menjadi salah satu target terapi kanker. Beberapa terapi kanker yang diarahkan pada penghambatan angiogenesis yang saat ini tersedia, terutama ditujukan pada penghambatan VEGF (VEGF *blocker*) (Kubota, 2012). VEGFR-2 merupakan reseptor VEGF utama yang memperantarai aktivitas angiogenik VEGF melalui jalur yang berbeda dengan jalur yang mengatur proliferasi, migrasi, dan diferensiasi sel endotel. VEGFR-1 mempengaruhi sinyal transduksi VEGF lebih lemah daripada VEGFR-2, sedangkan VEGFR-3 lebih banyak bekerja pada sistem limfatik (Yi *et al.*, 2008).

Sebagian besar penderita kanker (90%) meninggal bukan karena kanker primernya, melainkan karena metastasis jauhnya (Harrington, 2011). Metastasis jauh, proliferasi sel kanker, invasi, dan angiogenesis dalam patogenesis kanker dikaitkan dengan protein *cyclooxygenase-2/COX-2* dan *vascular endothelial growth factor/VEGF* (Ding *et al.*, 2013).

Dengan demikian sangat rasional untuk menggali terapi antikanker yang diarahkan pada penghambatan COX-2, VEGF, dan VEGFR-2, yang berperan besar dalam metastasis kanker.

Penelitian ini menguji aktivitas senyawa 3,4,6-THX terhadap sel kanker kolorektal WiDR. Sel WiDR diisolasi dari seorang wanita penderita adenokarsinoma kolon dan merupakan turunan dari sel kanker kolorektal lain, yaitu HT-29 dan dianggap identik, termasuk dalam gambaran perubahan genetik dan epigenetiknya (Ahmed *et al.*, 2013). Karakteristik sel WiDR di antaranya adalah tingginya ekspresi HIF-1 $\alpha$  dan VEGF (Kuwai *et al.*, 2003) dan COX-2 (Palozza *et al.*, 2005), sehingga sel ini sesuai untuk digunakan dalam penelitian.

## **METODE PENELITIAN**

### **Sel kanker**

Sel kanker yang diteliti adalah sel WiDR (kanker kolorektal) dan sel Vero (sel normal), yang merupakan koleksi Laboratorium Parasitologi FK UGM Yogyakarta. Sel kanker ditumbuhkan dalam medium yang sesuai, yaitu RPMI untuk sel WiDR dan M199 untuk sel Vero, dengan penambahan penicillin 100 U/mL–streptomycin 100  $\mu$ L dan fungizone 1%. Sel dikultur di dalam inkubator 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komite Etik FK UGM–RSUP Dr Sardjito, dengan nomor KE/FK/399/EC/2016.

### **Reagen dan Bahan Kimia**

Sebagai kontrol positif digunakan obat doxorubicin (Dankos, Jakarta). Medium kultur IMDM and M199 diperoleh dari Gibco BRL. Fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, fungizone, (3-(4,5-dimethyl tiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromida)/MTT, Sodium duodecyl sulphate (SDS), and dimethyl sulfoxide (DMSO) diperoleh dari Sigma Chem (St Louis, USA), kit ekstraksi RNA total (Geneaid Biotech Ltd, New Taipei City, Taiwan), kit sintesis complementary DNA (cDNA) (Toyobo, Osaka, Jepang), primer untuk gen COX-2, VEGF, dan VEGFR-2 (IDT, Singapura).

### **Senyawa Uji**

Senyawa uji berupa senyawa sintetis turunan xanton, yaitu 3,4,6-trihidroksixanton (3,4,6-THX), hasil sintesis Emmy Yuanita (Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan IPA (FMIPA) Universitas Mataram) dan doxorubicin. Doxorubicin digunakan sebagai pembanding dalam uji sitotoksik, dengan konsentrasi 2000  $\mu$ g/mL. Sebanyak 10 mg senyawa xanton dilarutkan dalam 100  $\mu$ L DMSO, sehingga diperoleh konsentrasi akhir sebesar

100.000 µg/mL. Senyawa xanton ini diuji aktivitas sitotoksik dan antiproliferatifnya, serta pengaruhnya terhadap ekspresi mRNA COX-2, VEGF, dan VEGFR-2.

## Prosedur

### Uji aktivitas sitotoksik

Pengukuran aktivitas sitotoksik dilakukan menurut prosedur dalam penelitian sebelumnya (Mosmann, 1983) dengan modifikasi. Sebanyak 100 µL suspensi sel dengan kepadatan  $1 \times 10^4$  sel/sumuran dimasukkan ke dalam tiap sumuran pada *microplate* 96 sumuran. Sel diinkubasi di dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, media sel dibuang dan diganti dengan media baru yang berisi larutan sampel dalam berbagai konsentrasi. Sebagai pembanding digunakan obat kemoterapi standar yaitu doxorubicin. Setelah diinkubasi selama 24 jam, sel dicuci dan ditambahkan 100 µL media baru dan 10 µL larutan MTT (5 mg/mL). Sel diinkubasi selama 4 jam kemudian ditambahkan 100 µL larutan *stopper* SDS 10% dalam HCl 0,01 N untuk melarutkan formazan. Sel dibiarkan selama semalam pada suhu kamar dalam ruang gelap. Absorbansi sel diukur dengan ELISA *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm. Persentase sel *viable* (sel hidup) dihitung dengan rumus :

$$\text{Persentase (\%)} \text{ viabilitas sel} = \frac{A_{\text{perlakuan}} - A_{\text{media control}}}{A_{\text{kontrol sel}} - A_{\text{media control}}} \times 100\% \quad A = \text{absorbansi}$$

Parameter sitotoksisitas (IC<sub>50</sub>) ditentukan berdasarkan analisis probit, yang menghubungkan konsentrasi senyawa uji dengan jumlah kematian sel (dalam persen). Nilai IC<sub>50</sub> melambangkan konsentrasi obat dalam µg/mL yang mampu menghambat 50% pertumbuhan sel. Indeks selektivitas (IS) dihitung dengan membandingkan nilai IC<sub>50</sub> sel kanker dengan IC<sub>50</sub> pada sel normal. Perbandingan antara IC<sub>50</sub> sel kanker terhadap sel normal lebih dari 3 (tiga) menunjukkan bahwa senyawa xanton bersifat selektif terhadap sel kanker (Prayong *et al.*, 2008).

### Uji antiproliferatif

Uji antiproliferatif dilakukan dengan cara yang sama seperti uji sitotoksik, namun dilakukan inkubasi perlakuan selama 24, 48, dan 72 jam. Konsentrasi yang digunakan adalah sebesar  $\frac{1}{4} \times \text{IC}_{50}$ ,  $\frac{1}{2} \times \text{IC}_{50}$ ,  $1 \times \text{IC}_{50}$ , dan  $2 \times \text{IC}_{50}$ . Hasil pengukuran absorbansi sel kanker pada 24, 48, dan 72 jam dibandingkan sehingga dapat diketahui efek antiproliferatif senyawa uji.

### Uji ekspresi mRNA COX-2, VEGF, dan VEGFR-2

Pengujian pengaruh senyawa xanton sebagai terhadap ekspresi COX-2, VEGF, dan VEGFR-2 dilakukan dengan mengukur kadar mRNA COX-2, VEGF, dan VEGFR-2 pada sel kanker yang sudah diberi perlakuan dengan senyawa xanton. Sebelum ekspresi mRNA diukur, dilakukan isolasi mRNA dan sintesis cDNA dari mRNA sel WiDR yang telah diberi perlakuan.

Sebelum dilakukan isolasi RNA total dari kultur sel, sel diberikan perlakuan dengan senyawa xanton dengan konsentrasi sebesar  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$  dan  $1 \times IC_{50}$ . Sebagai kontrol, digunakan sel kanker yang hanya diberikan medium. Setelah 24 jam perlakuan, sel dipanen untuk memperoleh RNA total dengan total RNA mini kit sesuai petunjuk manufaktur. Selanjutnya dilakukan sintesis complementary DNA (cDNA) dengan kit untuk sintesis cDNA sesuai dengan instruksi manufaktur. Pengukuran ekspresi mRNA dilakukan menggunakan *quantitative real time Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) sesuai metode Meng *et al.* (2016) untuk VEGFR-2, dan Sugimoto *et al.* (2007) untuk COX-2 dan VEGF. Adapun proses amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan reagen primer sesuai urutan (*sequence*) sebagaimana tercantum dalam Tabel 1 berikut. Kondisi mesin qRT-PCR diatur sesuai dengan instruksi manufaktur, yang tercantum dalam Tabel 2.

Tabel 1. Urutan basa (*sequence*) untuk amplifikasi DNA

Gen	COX-2	VEGF	VEGFR-2
Urutan basa			
• Forward	CCA GCA CTT CAC GCA TCA GT	GCA GAC CAA AGA AAG ATA GAG CAA G	GTG TCA GAA TCC CTG CGA AGT A
• Reverse	ACG CTG TCT AGC CAG AGT TTC AC	CGC CTC GGC TTG TCA CAT	GAA ATG GGA TTG GTA AGG ATG A
Referensi	Sugimoto <i>et al.</i> (2007)	Sugimoto <i>et al.</i> (2007)	Meng <i>et al.</i> (2016)

Tabel 2. Kondisi mesin qRT-PCR untuk pengujian ekspresi mRNA COX-2, VEGF, dan VEGFR-2

Aktivasi enzim polimerase	95°C	10 menit	1 siklus
Denaturasi	95°C	5 detik	40 siklus
Annealing/extension	60–65°C	15–30 detik	

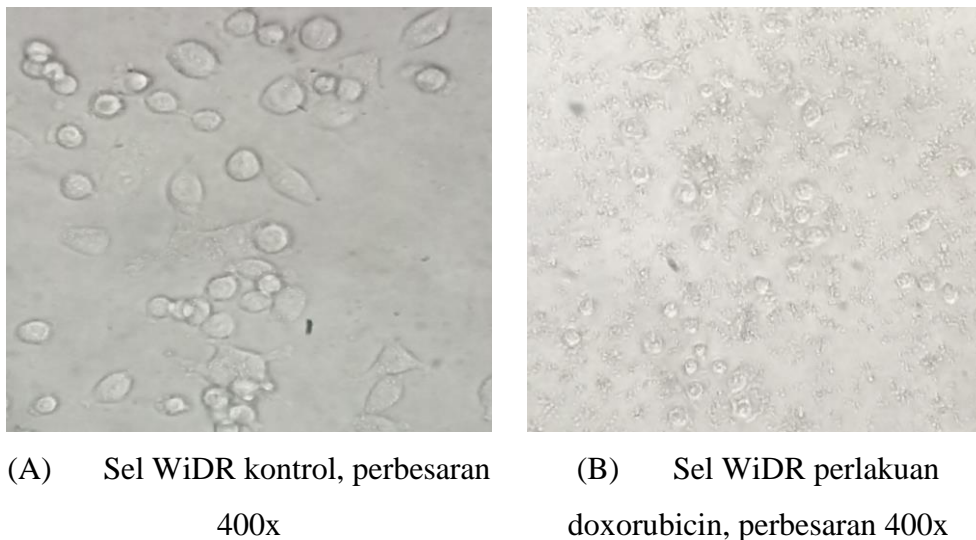
Kalkulasi ekspresi gen secara relatif dilakukan dengan *software* yang sesuai, dengan metode kuantifikasi relatif dengan rumus  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (metode Livak) (Livak & Schmittgen, 2001). Untuk setiap cDNA, kadar mRNA gen target dinormalisasi dengan kadar mRNA  $\beta$ -aktin. Eksperimen diulang dua kali (duplo).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Aktivitas sitotoksik senyawa 3,4,6-THX

Uji sitotoksik dilakukan untuk mengetahui kemampuan senyawa xanton dalam membunuh sel kanker kolorektal (WiDR), yang dinyatakan dalam Inhibitory Concentration 50% (IC<sub>50</sub>). Semakin kecil nilai IC<sub>50</sub> xanton terhadap sel kanker menunjukkan bahwa diperlukan konsentrasi sampel kecil untuk membunuh 50% sel kanker. Dengan demikian suatu senyawa dengan aktivitas sitotoksik yang tinggi ditandai dengan nilai IC<sub>50</sub> yang lebih rendah. Adapun IC<sub>50</sub> xanton terhadap sel Vero yang lebih besar, menunjukkan bahwa senyawa bersifat tidak toksik terhadap sel normal. Perbandingan antara IC<sub>50</sub> sel kanker terhadap sel normal lebih dari 3 (tiga) menunjukkan bahwa senyawa xanton bersifat selektif terhadap sel kanker (Prayong *et al.*, 2008).

Sel WiDR merupakan sel kanker kolorektal turunan dari sel lini HT-29 dan dianggap identik (Chen *et al.*, 1987). Pengamatan secara mikroskopis setelah pemberian senyawa uji dan proses inkubasi selama 24 jam, menunjukkan adanya perbedaan morfologi antara kelompok kontrol dan perlakuan. Pada kelompok xanton dan doxorubicin, didapatkan adanya sel-sel kanker yang terlepas dari dasar plate dan mengandung debris sel, bentuk sel berubah menjadi lebih bulat dan berukuran kecil, terdapat kondensasi kromatin dan pengerutan membran sel; sedangkan kelompok kontrol menunjukkan morfologi sel normal dan tanpa kondensasi kromatin (membran sel utuh dan bersih tanpa debris) (Gambar 1). Hasil uji sitotoksik senyawa xanton terhadap sel WiDR dapat dilihat dalam Tabel 3.



Gambar 1. Morfologi sel WiDR pasca perlakuan. (A) Kelompok kontrol sel, (B) Kelompok perlakuan doxorubicin konsentrasi 10 µg/mL.

Tabel 3. Hasil uji sitotoksik terhadap sel WiDR dan sel Vero<sup>a</sup>

Compound	IC <sub>50</sub> value (µg/mL) <sup>b</sup>		SI value <sup>c</sup>
	WiDR	Vero	
3,4,6-THX	9.23 ± 2.58	612.88 ± 49.68	66.37
Doxorubicin	1.65 ± 0.19	81.48 ± 15.64	49.53

<sup>a</sup> Nilai yang diperoleh adalah hasil rata-rata dari tiga eksperimen. Sel WiDR viabel dihitung setelah inkubasi kultur sel dengan senyawa selama 24 jam dan diukur dengan metode MTT

<sup>b</sup> Kriteria menurut Council of Scientific and Industrial Research (CSIR): inaktif (rata-rata IC<sub>50</sub> > 50 µg/mL), lemah (15 µg/mL < rata-rata IC<sub>50</sub> < 50 µg/mL), sedang (6.25 µg/mL < rata-rata IC<sub>50</sub> < 15 µg/mL), poten/kuat (rata-rata IC<sub>50</sub> < 6.25 µg/mL) (Franca *et al.*, 2013)

<sup>c</sup> Indeks selektivitas (IS) : dinyatakan selektif jika >3

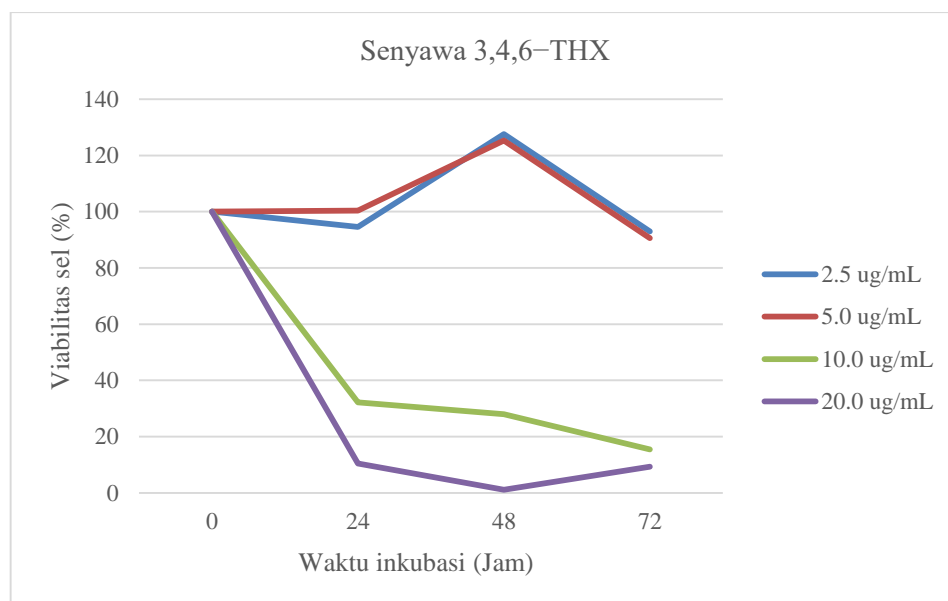
Council of Scientific and Industrial Research (CSIR) membagi aktivitas sitotoksik suatu senyawa menjadi empat kategori berdasarkan nilai IC<sub>50</sub>, yaitu inaktif (IC<sub>50</sub> > 50 µg/mL), lemah (15 – 50 µg/mL), sedang (6,25 – < 15 µg/mL), dan kuat/poten (< 6,25 µg/mL) (Franca *et al.*, 2013). Berdasarkan kriteria tersebut, maka senyawa 3,4,6-THX tergolong memiliki aktivitas sitotoksik sedang. Dalam suatu skrining aktivitas sitotoksik suatu senyawa, nilai IC<sub>50</sub>



yang memenuhi kriteria sedang dan kuat dapat dilanjutkan untuk dilakukan uji berikutnya (Fouche *et al.*, 2008).

### Aktivitas antiproliferatif senyawa 3,4,6-THX

Uji ini dilakukan dengan cara yang sama dengan uji sitotoksik, hanya saja pengamatan dilanjutkan selain untuk 24 jam juga 48 dan 72 jam, dengan tujuan untuk melihat kemampuan senyawa xanton dalam menghambat pertumbuhan sel WiDR. Sebagaimana tercantum dalam Tabel 3, senyawa 3,4,6-THX mempunyai  $IC_{50}$  sebesar 9,23  $\mu\text{g/mL}$ ; namun untuk penyederhanaan, konsentrasi yang digunakan adalah 2,5; 5; 10; dan 20  $\mu\text{g/mL}$ . Adapun plot waktu inkubasi versus persentase viabilitas sel WiDR dapat dilihat dalam Gambar 2 berikut.



Gambar 2. Plot waktu inkubasi versus viabilitas sel (%) senyawa 3,4,6-THX

Pada dua konsentrasi terendah (2,5 dan 5  $\mu\text{g/mL}$ ) senyawa 3,4,6-THX tidak mampu menghambat pertumbuhan sel, terbukti dari tetap bertambahnya viabilitas sel pada kedua konsentrasi tersebut. Meskipun pada inkubasi selama 72 jam pada kedua konsentrasi menunjukkan penurunan viabilitas sel, namun tetap berbeda secara bermakna dengan kelompok 10 dan 20  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0,00$ ). Penghambatan pertumbuhan pada konsentrasi 2,5  $\mu\text{g/mL}$  tampak lebih baik daripada konsentrasi 5  $\mu\text{g/mL}$ , namun secara statistik perbedaan ini tidak signifikan (nilai masing-masing sebesar 0,248; 0,688; dan 0,477 untuk waktu inkubasi selama 24, 48, dan 72 jam).

Kelompok perlakuan konsentrasi 10 dan 20  $\mu\text{g/mL}$  menunjukkan kemampuan penghambatan pertumbuhan sel WiDR yang lebih baik, sebagaimana ditunjukkan oleh persentase kematian sel lebih besar dari 50% dengan pola penurunan yang serupa. Pada masa

inkubasi 48 jam, konsentrasi 20 µg/mL mampu menghambat pertumbuhan sel lebih baik daripada konsentrasi 10 µg/mL ( $p=0,001$ ), sedangkan pada inkubasi 72 jam efek penghambatan oleh konsentrasi 10 dan 20 µg/mL menunjukkan kemampuan yang sebanding ( $p=0,087$ ). Hasil ini menunjukkan bahwa aktivitas antiproliferatif senyawa 3,4,6-THX dimulai pada konsentrasi 10 µg/mL dan mencapai efek plateu (statis) pada hari kedua (48 jam).

Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa senyawa 3,4,6-THX ini juga mempunyai aktivitas antimalaria (Syahri *et al.*, 2017), meskipun nilai  $IC_{50}$  nya lebih tinggi daripada obat standar klorokuin. Hal ini menunjukkan potensi senyawa antimalaria sebagai antikanker, karena sebanyak 93% senyawa yang berefek antimalaria ternyata menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap berbagai jenis sel kanker (Duffy *et al.*, 2012). Dengan demikian, hasil penelitian ini sejalan dengan beberapa penelitian sebelumnya mengenai aktivitas antikanker pada berbagai senyawa antimalaria.

### **Pengaruh senyawa 3,4,6-THX terhadap ekspresi mRNA COX-2, VEGF, dan VEGFR-2**

Sebelum dilakukan pengujian ekspresi mRNA, dilakukan isolasi RNA total menggunakan total RNA isolation kit. Total RNA hasil isolasi digunakan untuk sintesis cDNA. Sintesis cDNA dilakukan dengan kit untuk sintesis cDNA. Proses ini dilakukan dengan menggunakan enzim reverse transcriptase (satu RNA-dependent DNA polymerase) yang bekerja pada rantai tunggal RNA. Enzim ini menggunakan mRNA sebagai template dan menghasilkan DNA komplementer sesuai dengan pasangan urutan basa pada mRNA. Sintesis cDNA diawali dengan proses reverse transcription urutan basa pada RNA, dilanjutkan dengan amplifikasi urutan DNA dengan polymerase chain reaction (PCR) sehingga diperoleh urutan basa lengkap pada DNA.

cDNA hasil sintesis siap digunakan untuk proses selanjutnya, yaitu amplifikasi gen spesifik dengan mesin qRT-PCR. Amplifikasi gen menggunakan primer dengan urutan basa yang sesuai. Dalam penelitian ini digunakan urutan basa sesuai penelitian sebelumnya yang dapat dilihat dalam Tabel 1. Urutan basa ini diperiksa kesesuaiannya dengan gen yang dicari, dengan cara mengkonfirmasi melalui database nukleotida di <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Hasil pengecekan urutan basa ketiga gen menunjukkan kesesuaian 100% dengan gen yang dimaksud (similarity 100%). Dengan kesesuaian yang mencapai 100%, maka primer ini dapat digunakan.

Gen target COX-2 diukur menggunakan primer gen target sesuai penelitian sebelumnya (Tabel 1). Hasil blasting urutan basa dalam primer ini telah memenuhi 100%

kesesuaian dengan gen target. Dalam pelaksanaan qRT-PCR, data yang diperoleh berupa nilai Ct untuk tiap sampel (duplo). Kedua nilai Ct untuk tiap sampel dirata-rata dan dibandingkan dengan nilai Ct pada kontrol sampel. Hasil pengukuran nilai Ct dikonversi menjadi tingkat ekspresi dengan menghitung sesuai rumus  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  sebagaimana disebutkan sebelumnya. Tingkat ekspresi ketiga gen (COX-2, VEGF, dan VEGFR-2) untuk berbagai konsentrasi adalah tersebut dalam Tabel 4 berikut ini.

Tabel 4. Tingkat ekspresi mRNA COX-2, VEGF, dan VEGFR-2 pada berbagai konsentrasi

Konsentrasi	Tingkat ekspresi		
	COX-2	VEGF	VEGFR-2
$\frac{1}{2} \times IC_{50}$	0.915	1.593	1.251
$1 \times IC_{50}$	0.624	1.304	0.902
<i>P value</i>	0.047	0.004	0.006

Tabel di atas menampilkan perbandingan tingkat ekspresi ketiga gen pada dua konsentrasi, yaitu  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$  dan  $1 \times IC_{50}$ . Untuk tingkat ekspresi COX-2, secara keseluruhan hasil menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kedua perlakuan. Pada konsentrasi  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ , senyawa xanton belum memberikan efek, namun pada konsentrasi  $1 \times IC_{50}$  mampu menekan ekspresi COX-2 hingga lebih sepertiganya (lebih rendah sekitar 37%) dibandingkan kelompok kontrol. Hal ini dapat diartikan bahwa pemberian perlakuan senyawa xanton pada sel kanker WiDR menekan ekspresi gen COX-2 pada konsentrasi  $1 \times IC_{50}$ , yaitu sebesar 10  $\mu\text{g/mL}$ . Belum diketahui apakah penekanan ekspresi ini berbanding lurus dengan konsentrasi atau tidak, karena tidak dilakukan pengujian terhadap konsentrasi yang lebih tinggi. Namun merujuk pada hasil uji antiproliferatifnya, kemungkinan efek ini tidak akan bertambah/meningkat.

Kemampuan senyawa 3,4,6-THX menekan ekspresi COX-2 pada sel WiDR sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menguji kemungkinan mekanisme senyawa sebagai inhibitor enzim COX-2 secara *in silico*. Senyawa 3,4,6-THX mampu menempati sisi aktif pada reseptor enzim COX-2 dengan energi yang rendah (Miladiyah *et al.*, 2017), di mana energi rendah ini dikaitkan dengan stabilitas ikatan ligand dengan reseptornya. Interaksi ligan-reseptor yang stabil ditandai dengan pembentukan ikatan hidrogen dan jarak ikatan yang kecil. Penelitian *in vitro* lainnya juga menunjukkan kemampuan senyawa xanton dari alam dalam menghambat ekspresi enzim COX-2. Senyawa xanton alam dapat menghambat proses inflamasi

Terhadap tingkat ekspresi VEGF dan VEGFR-2, kedua konsentrasi memberikan pengaruh berbeda terhadap sel kanker WiDR dibandingkan kelompok kontrol. Hal yang menarik adalah bahwa pemberian perlakuan tidak menyebabkan penurunan tingkat ekspresi VEGF pada sel kanker, namun justru meningkatkan ekspresinya. Penelitian ini berbeda dengan beberapa penelitian terdahulu yang menunjukkan kemampuan senyawa xanton dari alam dalam menghambat proses angiogenesis secara *in vitro* dan *in vivo* (Yang *et al.*, 2013; Shiozaki *et al.*, 2013; Jittiporn *et al.*, 2014). Ketiga penelitian menunjukkan kemampuan senyawa xanton alami dalam menghambat migrasi, proliferasi, dan pembentukan tubuler sel human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Namun yang perlu diperhatikan adalah bahwa dalam ketiga penelitian, yang digunakan adalah sel normal, yaitu HUVEC, bukan sel lini kanker. Belum diketahui apakah terhadap sel lini kanker, senyawa xanton alam tersebut juga menunjukkan aktivitas penghambatan ekspresi VEGF. Ketiga penelitian tersebut tidak menunjukkan mekanisme penghambatan angiogenesisnya, termasuk jalur yang terlibat.

Dalam hal ekspresi VEGFR-2, tampak bahwa pada konsentrasi 1 x IC<sub>50</sub>, tingkat ekspresi VEGFR-2 lebih rendah daripada kelompok ½ x IC<sub>50</sub>. Meskipun lebih rendah, namun perbedaan ini tidak signifikan secara statistik. Belum diketahui apakah dengan menaikkan konsentrasi senyawa 3,4,6-THX, penghambatan ini akan menjadi lebih baik. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai pengaruh konsentrasi yang lebih tinggi daripada 1 x IC<sub>50</sub> terhadap ekspresi VEGFR-2, sehingga dapat diketahui apakah penghambatan ini bersifat *concentration-dependent* atau *non concentration-dependent*.

## **KESIMPULAN**

Senyawa 3,4,6-THX menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker kolorektal WiDR dengan nilai penghambatan (IC<sub>50</sub>) sebesar 9,23 µg/mL. Aktivitas antiproliferasi senyawa 3,4,6-THX dimulai pada konsentrasi 1 x IC<sub>50</sub>, dan efek antiproliferasi ini tidak bersifat *concentration-dependent*. Uji ekspresi gen senyawa 3,4,6-THX terhadap sel kanker WiDR menunjukkan kemampuan senyawa untuk menekan ekspresi COX-2 sebesar 37% dibandingkan sel kontrol, namun tidak mampu menekan ekspresi VEGF dan VEGFR-2. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa sifat antikanker senyawa 3,4,6-THX diperankan oleh kemampuannya dalam menekan ekspresi enzim COX-2, yang terlibat dalam proses inflamasi kronis dalam patologi kanker.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini terlaksana dengan dukungan dana dari Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi (Kemristekdikti) melalui program Beasiswa Pendidikan Pascasarjana Dalam Negeri (BPPDN) dan hibah Penelitian Disertasi Doktor dengan nomor 004/DirDPPM/70/DPPM/DisertasiDoktor-KEMENRISTEK DIKTI/IV/2017. Peneliti juga ingin mengucapkan terima kasih kepada Mbak Rumbiwati (teknisi Laboratorium Parasitologi FK UGM) dan Mbak Fatin (teknisi Laboratorium Riset Terpadu FK UGM) atas bantuannya dalam pelaksanaan penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, D., Eide, P. W., Eilertsen, I. a, Danielsen, S. A, Eknæs, M., Hektoen, M., ... Lothe, R. A. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, 2(0424), e71.
- Benazzi, C., Al-Dissi, A., Chau, C. H., Figg, W. D., Sarli, G., Oliveira, J. T. De, & Gärtner, F. (2014). Angiogenesis in spontaneous tumors and implications for comparative tumor biology. *The Sci World J*, 2014.
- Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J., & Forman, D. (2012). Global cancer transitions according to the Human Development Index ( 2008 – 2030 ): a population-based study. *Lancet Oncol*, 13(August), 790–801.
- Chen, T. R., Drabkowski, D., Hay, R. J., Macy, M., & Peterson, W. (1987). WiDr is a derivative of another colon adenocarcinoma cell line, HT-29. *Cancer Genet Cytogenet*, 27, 125–134.
- Ding, D., Xi, P., Zhou, J., Wang, M., & Cong, Y.-S. (2013). Human telomerase reverse transcriptase regulates MMP expression independently of telomerase activity via NF-κB-dependent transcription. *FASEB J.*, 27, 4375–83.
- Dubois, R., Shao, J., & Danielbeauchamp, R. (1996). G1Delay inCells Overexpressing Prostaglandin Endoperoxide. *Cancer Res*, 56, 733–738.
- Duffy, R., Wade, C., & Chang, R. (2012). Discovery of anticancer drugs from antimalarial natural products: A MEDLINE literature review. *Drug Discovery Today*, 17(17-18), 942–953.
- Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Intern J Cancer*, 127(12), 2893–917.

- Fouche, G., Cragg, G. M., Pillay, P., Kolesnikova, N., Maharaj, V. J., & Senabe, J. (2008). In vitro anticancer screening of South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*, *119*, 455–461.
- Franca, H. S., Rocha, L., Fernande, C. P., Ruiz, A. L. T., & Carvalho, J. E. de. (2013). Antiproliferative activity of the hexanic extract and phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*. *Brazilian J Pharmacognosy*, *23*, 844–847.
- Harrington, K. J. (2011). Biology of cancer. *Medicine*, *39*, 689–692.
- International Agency for Research on Cancer [IARC] (2013). Latest world cancer statistics Global cancer burden rises to 14 . 1 million new cases in 2012 : Marked increase in breast cancers must be addressed. *IARC*, (December 2013). Retrieved from [http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223\\_E.pdf](http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223_E.pdf)
- Jittiporn, K., Suwanpradid, J., Patel, C., Rojas, M., Thirawarapan, S., Moongkarndi, P., ... Caldwell, R. (2014). Anti-angiogenic actions of the mangosteen polyphenolic xanthenes derivatives alpha mangostin. *Microvasc Res*, *93*, 72–79.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2013). *Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 87 tahun 2013. Kementerian Kesehatan republik Indonesia*. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Kubota, Y. (2012). Tumor Angiogenesis and Anti-angiogenic Therapy. *The Keio J Med*. doi:10.2302/kjm.61.47
- Kuete, V., Sandjo, L. P., Nantchouang, J. L., Fouotsa, H., Wiench, B., & Efferth, T. (2014). Cytotoxicity and modes of action of three naturally occurring xanthenes ( 8-hydroxycudraxanthone G , morusignin I and cudraxanthone I ) against sensitive and multidrug-resistant cancer cell lines. *Phytomed*, *21*, 315–322.
- Kuwai, T., Kitadai, Y., Tanaka, S., Onogawa, S., Matsutani, N., Kaio, E., ... Chayama, K. (2003). Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is associated with tumor vascularization in human colorectal carcinoma. *Intern J Cancer*, *105*, 176–181.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2<sup>-X</sup>  $\Delta\Delta$  C T Method. *Methods*, *25*, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Mathers, C. D., & Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine*, *3*(11), e442.

- Meng, Q., Shao, L., Luo, X., Mu, Y., Xu, W., Gao, L., ... Cui, Y. (2016). Expressions of VEGF-A and VEGFR-2 in placentae from GDM pregnancies. *Reprod Biol Endocrinol*, 14, 61.
- Miladiyah, I., Jumina, J., Haryana, S. M., & Mustofa, M. (2017). In silico molecular docking of xanthone derivatives as cyclooxygenase-2 inhibitor agents. *Int J Pharm Pharm Sci*, 9(3), 98–104.
- Mohan, S., Ibrahim, S., Kamalidehghan, B., Syam, S., Sue, K., Saad, N., ... Zajmi, A. (2012). Involvement of NF- $\kappa$ B and Bcl2/Bax signaling pathways in the apoptosis of MCF7 cells induced by a xanthone compound Pyranocycloartobioxanthone A. *Phytomed*, 19, 1007–1015.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55–63.
- Palozza, P., Serini, S., Maggiano, N., Tringali, G., Navarra, P., Ranelletti, F. O., & Calviello, G. (2005). beta-Carotene downregulates the steady-state and heregulin-alpha-induced COX-2 pathways in colon cancer cells. *J Nutr*, 135(August 2004), 129–36.
- Pinto, M. M. M., Sousa, M. E., & Nascimento, M. S. J. (2005). Xanthone derivatives: new insights in biological activities. *Curr Med Chem*, 12, 2517–2538.
- Prayong, P., Barusrux, S., & Weerapreeyakul, N. (2008). Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. *Fitoterapia*, 79, 598–601.
- Rajasekaran, D., Manoharan, S., Silvan, S., Vasudevan, K., Baskaran, N., & Palanimuthu, D. (2013). Propapoptotic, Anti-Cell Proliferative, Anti-Inflammatory and Anti-Angiogenic Potential of Carnosic Acid during 7, 12-Dimethylbenz[a]anthracene-induced Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 10, 102–111.
- Shiozaki, T., Fukai, M., Hermawati, E., Juliawaty, L. D., Syah, Y. M., Hakim, E. H., ... Koyama, K. (2013). Anti-angiogenic effect of  $\alpha$ -mangostin. *J Nat Med*, 67, 202–206.
- Stroescu, C., Dragnea, A., Ivanov, B., Pechianu, C., Herlea, V., Sgarbura, O., & Popescu, I. (2008). Prognostic Significance in Hepatocellular Carcinoma. *J Gastrointestin Liver Dis*, 17(4), 411–417.
- Sugimoto, T., Koizumi, T., Sudo, T., Yamaguchi, S., Kojima, A., Kumagai, S., & Nishimura, R. (2007). Correlative expression of cyclooxygenase-1 (Cox-1) and human epidermal growth factor receptor type-2 (Her-2) in endometrial cancer. *Kobe Journal of Medical Sciences*, 53(5), 177–187.

- Syahri, J., Yuanita, E., Nurohmah, B., Wathon, M., Syafri, R., Armunanto, R., & Purwono, B. (2017). Xanthone as Antimalarial : QSAR Analysis , Synthesis , Molecular Docking and In-vitro Antimalarial Evaluation. *Oriental J Chem*, 33, 29–40.
- Takahashi, Y., Kawahara, F., Noguchi, M., Miwa, K., Sato, H., Seiki, M., ... Y, T. Y. (1999). Activation of matrix metalloproteinase-2 in human breast cancer cells overexpressing cyclooxygenase-1 or -2. *FEBS Lett*, 460, 145–148.
- Tsujii, M., Kawano, S., & DuBois, R. N. (1997). Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(April), 3336–3340.
- Workman, P., Al-lazikani, B., & Clarke, P. A. (2013). Genome-based cancer therapeutics : targets , kinase drug resistance and future strategies for precision oncology. *Curr Opinion in Pharmacol*, 13, 486–496.
- Yang, J., He, S., Li, S., Zhang, R., Peng, A., & Chen, L. (2013). *In vitro* and *in vivo* antiangiogenic activity of caged polyprenylated xanthenes isolated from *Garcinia hanburyi* Hook. f. *Molecules*, 18, 15305–15313.
- Yi, T., Yi, Z., Cho, S.-G., Luo, J., Pandey, M. K., Agarwal, B. B., & Liu, M. (2008). Gambogic acid inhibits angiogenesis an dprostate tumor growth by supressing VEGFR2 signaling. *Cancer Res*, 68(6), 1843–1850.
- Yu, Y., Zhang, Y., Shen, N., Zhang, R., & Lu, X. (2014). Effect of VEGF , P53 and telomerase on angiogenesis of gastric carcinoma tissue. *Asian Pacific J Trop Med*, 293–296.