

Uji sitotoksik metformin hidroklorida terhadap sel kanker payudara T47D

¹Irma Yanti Rangkuti, ²Poppy Anjelisa Zaitun Hasibuan, ³Tri Widyawati, ⁴M.Ichwan

¹Program studi magister ilmu biomedik fakultas kedokteran Universitas Sumatera Utara

²Departemen farmakologi fakultas farmasi Universitas Sumatera Utara

³Departemen farmakologi fakultas kedokteran Universitas Sumatera Utara

Irma_sundhana@yahoo.com

Abstrak. Latar Belakang. Kanker payudara merupakan penyakit berlebihnya pertumbuhan atau tidak terkendalinya perkembangan sel kanker payudara. Kanker merupakan suatu penyakit yang disebabkan kelainan genetik berupa mutasi DNA yang menyebabkan hilangnya kontrol pertumbuhan. Gangguan genetik ini menyebabkan terganggunya siklus sel dan apoptosis. Metformin merupakan suatu antihiperglikemik yang digunakan pada pasien diabetes melitus tipe 2. Penurunan risiko kanker terjadi pada pasien diabetes melitus tipe 2 yang menggunakan metformin. Uji sitotoksik untuk agen anti kanker merupakan uji skrining awal untuk menilai potensi efek anti kanker. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek sitotoksik metformin hidroklorida terhadap pertumbuhan sel kanker payudara T47D. Metode: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental uji invitro terhadap sel kanker payudara T47D yang dipaparkan metformin HCl konsentrasi 5000; 2500; 1250; 312.5 dan 156,25 μM selama 24 jam. Sebagai pembanding digunakan paclitaxel konsentrasi 1000; 500; 250; 31,25 dan 15,625 nM. Uji sitotoksik menggunakan metode MTT untuk menentukan IC_{50} . Data dianalisis menggunakan analisa probit. Hasil : IC_{50} metformin HCl adalah $13457.3 \pm 1096,5 \mu\text{M}$. IC_{50} paclitaxel adalah $1577.2 \pm 115.3 \text{ nM}$. Efek anti kanker metformin lebih kecil dibanding paclitaxel.

Kata Kunci: metformin HCl, T47D, uji sitotoksik, IC_{50}

Abstract. Breast cancer is a disease in which there is excessive growth or uncontrolled development of breast tissue cells. Cancer is a disease caused by genetic disorders caused by DNA mutations that cause loss of growth control. This genetic disorder affects the cell cycle and cell apoptosis and causes the formation of cancer. Metformin is an antihyperglycemic in type 2 diabetes mellitus patient. The decrease in cancer risk occurred in patients with type 2 diabetes mellitus who used metformin. Cytotoxic test for agent anti cancer is screening test to investigate the potency cancer effect of substance. The goal of this study was determining the cytotoxic effect of metformin hydrochloride to T47D breast cancer cell. The method : This study was experimental study, invitro test to T47D breast cancer cell using metformin HCl 5000; 2500; 1250; 312.5; and 156.25 μM for 24 hours. Paclitaxel used as positive control with concentration were 1000; 500; 250; 31,25 and 15,625 nM. Cytotoxic test using MTT method to determine IC_{50} . Data were analyzed using probit analysis using SPSS 22 version. The result of cytotoxic test showed that IC_{50} metformin HCl was $13457.3 \pm 1096,5 \mu\text{M}$. While IC_{50} paclitaxel as control was $1577.2 \pm 115.3 \text{ nM}$. The effect of cancer metformin HCl was lower than paclitaxel.

Keywords: metformin HCl, T47D, cytotoxic test, IC_{50}

Pendahuluan

Berdasarkan data Globocan IARC (*International Agency for Research on Cancer*) di tahun 2012 terdapat 14.067.894 kasus kanker baru dan 8.201.575 kematian kanker diseluruh dunia dengan tipe kanker terbanyak adalah kanker payudara, kanker prostat dan kanker paru. Diantara wanita kanker payudara merupakan kanker terbanyak di negara berkembang dengan estimasi 1,67 juta kasus baru pada tahun 2012.¹

Kanker payudara merupakan suatu penyakit terjadinya kelebihan pertumbuhan atau perkembangan tidak terkendali dari sel kanker payudara. Kanker payudara merupakan jenis kanker yang paling umum pada wanita, menempati urutan kelima di dunia, menyebabkan 522.000 kematian dan penyebab utama kematian wanita di negara berkembang (324.000 kematian). Insiden kanker pada wanita di Indonesia sekitar 134 per 100.000 populasi dengan kasus kanker payudara tertinggi 40 per 100.000 wanita. Estimasi Globocan, kematian di

Indonesia yang disebabkan kanker payudara sekitar 16,6 kematian per 100.000 populasi.¹

TP53 merupakan gen yang paling banyak bermutasi di kanker manusia dan untuk kanker payudara mutasi *p53* terjadi sekitar 35% yang biasanya terdapat pada karsinoma duktal, histopatologi agresif seperti ukuran tumor yang besar (>20 mm), limfonodi positif, reseptor estrogen (ER) dan reseptor progesteron (PR) negatif, anaplasia tingkat tinggi, dan laju proliferasi yang tinggi,² sehingga kanker payudara dengan mutasi *p53* memiliki angka ketahanan hidup yang lebih rendah dibandingkan penderita tanpa mutasi *p53*.^{3,4} Untuk pasien dengan mutasi *p53* sering mengalami relaps ketika diberikan *anthracycline-based monotherapy*.⁵ Studi lain menunjukkan bahwa pasien kanker payudara dengan mutasi *p53* memiliki respon yang lebih buruk terhadap mono terapi Doksorubisin.^{6,7} Resistensi terapi bukan hanya terhadap grup antrasiklin, tetapi juga terhadap grup non antrasiklin, CMF⁸ dan 5-fluorourasil dan mitomisin.⁶

Metformin, suatu biguanida merupakan obat pilihan penderita diabetes melitus (DM) tipe 2. Efek anti kanker metformin didasari adanya penurunan risiko kanker pada pasien DM tipe 2 yang menggunakan metformin.^{9,10,11}

Sel T47D merupakan suatu *continuous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara wanita 54 tahun yang mengekspresikan mutasi *p53* (*missense mutation*) pada residu 194 (*in zinc-binding domain, L2*).

Dikarenakan mutasi *p53* menyebabkan resistensi terhadap kemoterapi, dan metformin menunjukkan penurunan risiko kanker pada pasien DM yang menggunakannya, maka peneliti tertarik untuk mengetahui efek anti kanker metformin terhadap sel kanker payudara T47D.

Material dan metode

Penelitian ini menggunakan metformin HCl (didapatkan dari PT.Dexa Medica Palembang Indonesia).

Kultur sel

Penelitian ini menggunakan sel kanker payudara T47D yang berasal dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Sel ditanam dalam media RPMI yang mengandung 10% *Fetal Bovine Serum* (Gibco, USA), 2% Penicillin-Streptomycin (Gibco, USA), dan Fungizone (Amphotericin B) 0.5% (Gibco, USA) pada suatu *flask* didalam inkubator (5% CO₂/95% air) at 37°C.¹²

Pemeriksaan Viabilitas sel

Viabilitas sel T47D diperiksa menggunakan metode MTT. Sel dikultifikasi pada 96 well plates (Iwaki, Japan). Setiap sumuran mengandung 1x10⁴ sel. Sel diinkubasi di dalam inkubator (5% CO₂/95% udara) selama 24 jam. Setelah inkubasi 24 jam media kultur diganti dan setiap sumuran diberikan metformin dengan konsentrasi 5000; 2500; 1250; 312,5; 156,25 µM. Setelah 24 jam inkubasi, sel diinkubasi dengan 0.5 mg/mL MTT (Sigma-Aldrich, USA) selama 4 jam pada suhu 37°C. Setelah 4 jam, 10% SDS (Sigma-Aldrich, USA) stopper dalam 0.01 N HCl (Merck, USA) ditambahkan ke tiap sumuran. Lalu sel diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruangan dan dijaga dari cahaya. Setelah diinkubasi sel diperiksa absorbansinya menggunakan Elisa *microplate reader* (Bio-Rad, USA) pada panjang gelombang 595 nm. Elisa merekam absorbansi tiap sumuran, kemudian data tersebut diubah ke bentuk persentasi sel hidup dengan menggunakan formula berikut :

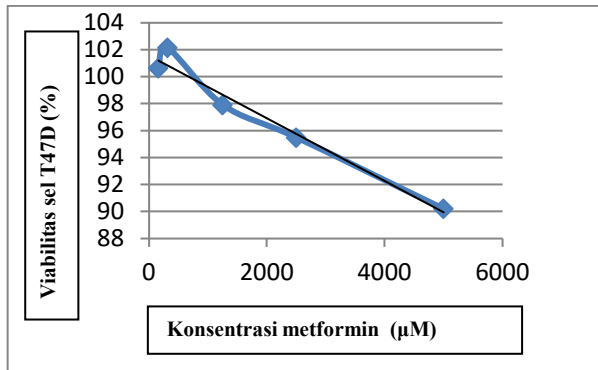
$$\% \text{ sel hidup} = \frac{B - C}{A - C} \times 100\% \quad (1)$$

A, B, dan C (1) merupakan absorbansi sel kontrol, absorbansi sel yang dipapar obat, dan absorbansi media kultur. Dengan menggunakan analisa probit didapatkan nilai IC₅₀, data di analisa menggunakan analisa statistik dengan nilai $p < 0.05$ berarti signifikan.¹³

Hasil dan pembahasan

Uji sitotoksik merupakan uji awal untuk menentukan potensi toksisitas suatu senyawa terhadap sel kanker dan sebagai parameter digunakan nilai IC₅₀.

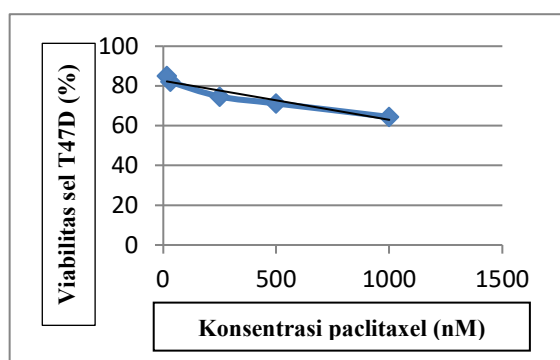
Hasil uji menunjukkan paparan metformin HCl selama 24 jam terhadap sel kanker payudara T47D dapat dilihat pada Gambar 1.1.



Gambar 1.1. Grafik efek metformin HCl terhadap viabilitas sel kanker payudara T47D.

Sel T47D dipaparkan metformin HCl selama 24 jam menggunakan serial konsentrasi 5000; 2500; 1250; 312,5; 156,25 μM. Setelah dianalisa menggunakan analisa probit didapatkan nilai IC_{50} metformin HCl $1345,3 \pm 1096,5$ μM.

Penelitian ini menggunakan paclitaxel sebagai kontrol dengan serial konsentrasi 1000; 500; 250; 31,25 dan 15,625 nM. Setelah dianalisis, didapatkan nilai IC_{50} paclitaxel $1577,2 \pm 115,3$ nM. Uji sitotoksik paclitaxel dapat dilihat pada Gambar 1.2.



Gambar 1.2. Grafik efek paclitaxel terhadap viabilitas sel kanker payudara T47D.

Melalui uji sitotoksik didapatkan metformin dapat menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D dengan konsentrasi lebih besar dibandingkan paclitaxel. Mekanisme penghambatan sel ini berawal dari efek penghambatan metformin pada kompleks I

rantai pernafasan di mitokondria.^{14, 15, 16} Hambatan di kompleks I rantai pernafasan menyebabkan menurunnya produksi ATP intrasel dan meningkatnya AMP dengan akibat selanjutnya terjadi stimulasi AMP-Kinase.¹⁷

Adenosine - monophosphate - activated protein kinase (AMPK) merupakan suatu regulator didalam semua sel eukaryotik. AMPK akan teraktivasi jika konsentrasi ATP rendah dan konsentrasi AMP meningkat.¹⁸

AMP-Kinase yang teraktivasi selanjutnya akan memfosforilasi berbagai substrat diantaranya ACC, HMG-CoA reduktase, PFKFB2, TBC1D1, TSC2, Raptor, TIF-1A, p-53, dll yang menyebabkan berbagai efek diantaranya aktivasi katabolisme, mencegah anabolisme pada proses sintesis asam lemak, kolesterol, RNA ribosomal, hambatan siklus sel melalui p53 yang menyebabkan peningkatan transkripsi p-21CDK (siklin dependen kinase, suatu inhibitor di dalam siklus sel dan memiliki efek terhadap apoptosis).¹⁹

Metformin memiliki efek anti tumor melalui kerjanya pada MAPK/ LKB1 / TOR yaitu TSC2 dan raptor.^{20, 21, 22, 23} Uji invitro sebelumnya menunjukkan efek penghambatan sel kanker terhadap sel WiDr cells untuk sel kanker kolorektal²⁴, sel Hep G-2 untuk sel kanker hati²⁵, dan sel MCF-7¹⁷, MDA-MB-231²⁶, MDA-MB-435 untuk sel kanker payudara.

Studi metformin terhadap sel T47D menunjukkan bahwa metformin menghambat pertumbuhan sel T47D melalui aktivasi AMPK dan histo H2B *monophybitinizing inhibition*²⁷ dan metformin menyebabkan apoptosis sel T47D dan meningkatkan ekspresi kaspase 8 dan 9.²⁸

Kesimpulan

Metformin menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D dengan IC_{50} $13457,3 \pm 1096,5$ μm. IC_{50} paclitaxel adalah $1577,2 \pm 115,3$ nM. Efek anti kanker metformin lebih kecil dibanding paclitaxel.

Daftar Pustaka

1. Kemenkes R., Stop Kanker, Jakarta: Pusat Data dan Informasi Kesehatan Republik Indonesia,

- 2016.
2. Lacroix, M., Toillon, R.A., Leclercq G, *p53 and breast cancer, an update*. Endocrine-related cancer. 13.2006.293-325.
3. Gasco, M and Crook, T. *p53 family members and chemoresistance in cancer: what we know and what we need to know*, Drug resist updatE, 6, 2003.323-328.
4. Olivier, M., Langerod, A., Carrieri, P., *The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer*, Clin cancer Res, 12, 2006,1157-1167.
5. Aas, T., Borresen, A-L., Geisler, S.. Specific p53 mutations are associated with denovo resistance to doxorubicin in breast cancer patients, *Nat med*; 2:1996.811-814.
6. Geisler S, Borresen-Dale AL, Johnsen H. TP53 gen mutations predict the response to neoadjuvant treatment with 5-fluorouracil and mitomycin in locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Re.* 9: 2003.5582-5588.
7. Di Leo, A., Tanner, M., Desmedt, C. P-53 gene mutations as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated with doxorubicin or docetaxel in the context of a phase III clinical trial, *Ann Oncol.*; 18. 2007. P. 997-1003.
8. Andersson, J., Larsson, L., Klaar, S. Worse survival for TP53 (p53) mutated breast cancer patients receiving adjuvant CMF, *Ann Oncol*; 16: 2005.743-748.
9. Lin, C., Huang, H., Chu, F., Fan, H., Chen, H., Chu, D., Wu, L., Wang, C., Chen, W., Lin, S., Ho. S *Association between gastroenterological malignancy and diabetes mellitus and anti diabetic therapy: A nationwide, population-based cohort study*, Plos one. . 2015.
10. Franciosi, M., Lucisano, G., Lapice, E., Strippoli, G. F. M., Pellegrini, F., Nicolucci, A *Plos one*. www. Plosone.org, 8(8).,2013.
11. Gandini, S., Puntoni, M., Heckman-Stoddard, B.M., Dunn, B. K., Ford, L., DeCensi, A., Szabo, E. Metformin and cancer risk and mortality: A systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders, *Cancer Prev Res (Phila)*, 7(9), 2014. 867-885.
12. A. Doyle and G. J. Bryan, *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedure in Biotechnology*. Chicester: John Willey & Sons, 1998.
13. E. Meiyanto, R. A. Susidarti, S. Handayani, and F. Rahmi, "Ekstrak Etanolik Biji Buah Pinang (Areca catechu L.) mampu menghambat proliferasi dan memacu apoptosis sel MCF-7," *Majalah Farmasi Indonesia*, vol.19, no.1., 2008. pp.12-19
14. Birsoy, K., Possemato, R., Lorbeer, F. K., Bayraktar, E. C., Thiru, P., Yucel, B., Wang, T., Chen, W.W., Clish, C.B., Sabatini, D.M, Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides, *Nature* 508:2014.108-112.
15. Owen, M. R., Doran, E., Halestrap, A. P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain, *Biochem. J.*, 348,2000.607-614.
16. Wheaton, W.W., Weinberg, S. E., Hamanaka, R. B., Soberanes, S., Sullivan, L. B., Anso, E., Glasauer, A., Dufour, E., Mutlu, G. M., Budigner, G.R.S., Chandel, N. S. *Metformin inhibits mitochondrial compleh I of cancer cells to reduce tumorigenesis*. eLife. Elifesciences.org.2014.
17. Queiroz, E.A.I.F., Puukila, S., Eichler, R., Sampaio, S.C., Forsyth, H. L., Lees, S. J., Barbosa, A. M., Dekker, R. F. H., Fortes, Z. B., Khaper, N. Metformin induces apoptosis and cell cycle arrest mediated by oxidative stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 breast cancer cells, *Plos one*,9(5). 2014.
18. Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J., Moller, D. E. Role of AMP activated protein kinase in mechanism of metformin action, *J Clin Invest*,108:2001.1167-1174.
19. Hardie, D. G. AMP-activated protein kinase- an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes & Development* 25:2011.1895-1908.
20. Kim, E. K., Song, M. J., Yoo, E. J., Choe, S. S., Park, S.D., Kim, J. B.. Regulatory role of glycogen synthase kinase 3 for transcriptional activity of ADD1/SREBP1c. *J Biol Chem.*,279: 2004. 19970-19975.
21. Koo, S. H., Flechner, L., Qi, L., Zhang, X., Screatton, R. A., Jeffries, S., Hedrick, S., Xu, W., Boussouar, F., Brindle, P., Takemori, H., Montminy, M. The CREB coactivator TORC2 is akey regulator of fasting glucose metabolism, *Nature*, 437:2005.1109-1011.
22. Shaw, R. J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R. L., Witters, L. A., De Pinho, R. A., Cantley, L. C. The tumor supressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Ptoc Natl Acad Sci USA*,101:2004.3329-35
23. Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., Carling, D.. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade, *Curr Biol*,13:2003. 2004-2008.
24. Wibowo, Y.C., Mahanani, M.R., Budiani, D.R., Mudigdo, A., , Metformin inhibits cyclin D1

- expression in a p53-deficient colon cancer cell line in vitro, *European Journal of Cancer*, 51(2). 2015.20
25. Cai, X., Hu, X., Cai, B., Wang, Q., Li, Y., Tan, X., Hu, H., Chen, X., Huang, J., Cheng, J., Jing, X. *Metformin suppresses hepatocellular carcinoma cell growth through induction of cell cycle G1/G0 phase arrest and p21CIP and p27KIP expression and downregulation of cyclin D1 invitro and invivo*, *Oncology reports* 30, 2013. p. 2449-2457.
 26. Li, P, Zhao, M., Parris, A. B., Feng, X and Yang, X. P53 is required for .metformin-induced growth inhibition, senescence and apoptosis in breast cancer cells, *Elsevier*, 2015.
 27. Du, Y., Zheng, H., Wang, J., Ren Y., Li, M., Gong, C., Xu, F and Yang, C. Metformin inhibits histone H2B monoubiquitination and downstream gene transcription in human breast cancer cells, *Oncology letters* 8: 2014.809-812.
 28. Haji, H. A., Sheibak, H., Khosravi, M and Asadi, J. The effect of metformin on the expression of caspase 3,8,9 and PARP-1 in human breast cancer cell line T47D, *IJHS*; 2(2): 2016.27-30.