

## Uji In Vitro Ekstrak n-Heksana Rimpang *Curcuma mangga* Val. terhadap Ekspresi VEGF pada sel 4T1

### In Vitro Test of *Curcuma mangga* Val. Rhizome's n-Hexane Extract in VEGF Expression on 4T1 Cells

Nurul Mukhlisa\*, Sitti Hadijah

Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Megarezky Makassar, Indonesia

\*Email Korespondensi: [nurulumukhlisa@unimerz.ac.id](mailto:nurulumukhlisa@unimerz.ac.id)

#### Abstrak

Kanker payudara merupakan salah satu penyakit penyebab kematian utama pada wanita di dunia. Prevalensi kanker payudara cenderung meningkat setiap tahunnya. Jumlah kasus di Indonesia mencapai 25.208 kasus dimana 20% merupakan *Triple Negative Breast Cancer* (TNBC). VEGF merupakan marker angiogenesis yang krusial dalam menstimulasi proliferasi sel endotel dan mengatur permeabilitas pembuluh darah yang memiliki peran penting dalam pertumbuhan, invasi, dan metastasis kanker payudara. Rimpang *Curcuma.mangga* Val. secara empirik digunakan masyarakat sebagai agen antikanker payudara. Ekstrak n-heksana *Curcuma mangga* Val. memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D dan MCF-7. Namun, belum ada penelitian yang menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana *Curcuma mangga* Val. mempunyai aktivitas sitotoksik pada sel kanker payudara TNBC. Pada penelitian ini dilakukan uji sitotoksitas ekstrak n-heksana *Curcuma mangga* Val. terhadap sel 4T1 secara MTT Assay dan pengujian imunositokimia penghambatan angiogenesis ekspresi protein VEGF. Hasil pengujian sitotoksitas menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana *Curcuma mangga* Val. bersifat sitotoksik terhadap sel 4T1 dengan nilai  $IC_{50}$  63,37  $\mu$ M; sedangkan nilai  $IC_{50}$  alpelisib (kontrol sel) sebesar 32,96  $\mu$ M. Uji imunositokimia menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan antara ekstrak n-heksana rimpang *Curcuma mangga* Val. dan alpelisib dalam penghambatan ekspresi VEGF. Sehingga disimpulkan bahwa ekstrak n-heksana rimpang *Curcuma mangga* Val. memiliki potensi antikanker TNBC melalui penghambatan protein VEGF.

**Kata Kunci:** TNBC, *Curcuma mangga* Val.; VEGF, 4T1

#### Abstract

Breast cancer is the most fatal disease to women in the world. Breast cancer prevalence tends to increase every year. Total 25,208 cases in which 20% is Triple Negative Breast Cancer (TNBC). VEGF

crucial angiogenic marker in stimulating endothelial cell proliferation and regulation vascular permeability which are important roles in breast cancer growth; invasion and metastasis. *Curcuma mangga* Val. rhizomes empirically are used as an herbal anti-breast cancer. N-hexane extract of *Curcuma mangga* Val. have antibreast cancer potency to T47D and MCF-7 cells. Therefore, it is necessary to conduct a study that examine the anti TNBC breast cancer of n-hexane extract of *Curcuma mangga* Val. In this study was carried out on n-hexane extract of *Curcuma mangga* Val. againsts 4T1 cells using MTT Assay and immunocytochemical test for inhibition of angiogenic VEGF protein expression. The result of cytotoxicity test showed that n-hexane extract of *Curcuma mangga* Val. is cytotoxic to 4T1 cells with  $IC_{50}$  63,37  $\mu$ M; while the  $IC_{50}$  alpelisib (positive control) was 32,96  $\mu$ M. Immunocytochemical test showed that there was no significant difference between n-hexane extract of *Curcuma mangga* Val. and alpelisib in inhibiting VEGF expression. So it can be concluded that n-hexane extract of *Curcuma mangga* Val. has anticancer potential for TNBC through inhibiting the VEGF protein expression.

**Keywords:** TNBC, *Curcuma.mangga* Val.; VEGF, 4T1

**Received:** 07 September 2023

**Accepted:** 28 October 2023

**DOI:** <https://doi.org/10.25026/jsk.v5i5.2037>



Copyright (c) 2023, Jurnal Sains dan Kesehatan (J. Sains Kes.).  
Published by Faculty of Pharmacy, University of Mulawarman, Samarinda, Indonesia.  
This is an Open Access article under the CC-BY-NC License.

#### How to Cite:

Mukhlisa, N., Hadijah, S., 2023. Uji In Vitro Ekstrak n-heksana Rimpang *Curcuma mangga* Val. terhadap Ekspresi VEGF pada sel 4T1. *J. Sains Kes.*, 5(5). 708-715. DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v5i5.2037>

## 1 Pendahuluan

Kanker payudara merupakan salah satu penyakit penyebab kematian utama pada wanita di dunia. Prevalensi kanker payudara cenderung meningkat pada setiap tahunnya. Indonesia berada pada peringkat pertama di Negara Asia dengan jumlah 65.858 kasus, 20% diantaranya merupakan pasien kanker payudara subtipe *Triple Negative Breast Cancer* (TNBC) [1]. TNBC merupakan salah satu subtipe kanker payudara yang tidak meng-overekspresikan hormon estrogen, progesteron, maupun HER2 [2]. Kemoterapi merupakan terapi yang paling efektif untuk pasien TNBC [3],[4]. Namun banyak pasien TNBC yang mengalami *drug resistant* dan menyebabkan peningkatan mortalitas [5].

TNBC memiliki kemampuan menyebar ke organ-organ tubuh yang lain [6]. Penyebaran sel kanker ke bersifat metastasis ke organ tubuh yang lain yang ditandai dengan angiogenesis. Salah satu marker pada proses angiogenesis adalah *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Pada pasien TNBC, VEGF diekspresikan secara berlebih sehingga dapat menjadi target untuk pengobatan TNBC [6],[7]. VEGF merupakan marker angiogenesis yang krusial dalam menstimulasi proliferasi sel endotel dan mengatur permeabilitas pembuluh darah yang memiliki peran penting dalam pertumbuhan, invasi, dan metastasis kanker payudara [8],[7], [9].

Rimpang *C. mangga* Val. secara empirik banyak digunakan masyarakat sebagai herbal antikanker payudara [10]. Ekstrak n-heksana

rimpang *Curcuma mangga* Val. berpotensi antikanker terhadap sel T47D dan MCF-7 [11]. Namun, belum ada penelitian secara *in vitro* yang menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana rimpang *Curcuma mangga* Val. mempunyai aktivitas sitotoksik pada sel kanker payudara TNBC, sehingga perlu dilakukan penelitian mengenai potensi ekstrak n-heksana *Curcuma mangga* Val. terhadap sel kanker payudara *triple negative* melalui kemampuannya terhadap penghambatan angiogenesis ekspresi protein VEGF.

Pada penelitian ini dilakukan pengujian penghambatan ekstrak n-heksana rimpang *Curcuma mangga* Val. terhadap angiogenesis sel TNBC (sel 4T1) dengan target protein VEGF secara *in vitro*.

## 2 Metode Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sel 4T1 (koleksi Departemen Parasitologi, FKMK-UGM), ekstrak n-heksana rimpang *Curcuma mangga* Val., apelisib (TargetMol, Shanghai, China), media kultur RPMI (Sigma), Fetal bovine serum (Gibco), PBS (Sigma), penicillin-streptomycin (Gibco), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) (Sigma), L-glutamin (Gibco), Tripsin-EDTA (Gibco), SDS (Merck), HCl (Merck), metanol, larutan hidrogen peroksida, novostain universal detection kit, antibodi monoclonal primer VEGF, xylol, dan mounting media.

Uji sitotoksik (MTT Assay): Sel 4T1 sebanyak  $10^4$  sel/sumuran ditanam ke dalam *96-wellplate* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dan kadar  $\text{CO}_2$  5%. Selanjutnya, larutan uji yang sudah dibuat dengan berbagai konsentrasi dimasukkan ke dalam *96-wellplate*. Setelah diinkubasi selama 24 jam tambahkan reagen MTT dan iinkubasi selama 4 jam. Reaksi pembentukan kristal formazan dihentikan dengan penambahan larutan *stopper*. Plate dibungkus aluminium foil dan dibiarkan semalam pada suhu ruang. Keesokan harinya, plate diukur absorbansinya menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm.

Uji Imunositokimia: Sel 4T1 sebanyak  $10^5$  dimasukkan ke dalam *24-wellplate* yang telah diberi *cover slip*, kemudian diamkan selama 3-30 menit dalam inkubator agar sel menempel pada *cover slip* kemudian inkubasi selama 24 jam. Setelah itu, sel diberi perlakuan dengan ekstrak n-heksana rimpang *Curcuma mangga* val. dan alpelisib sesuai  $\text{IC}_{50}$  yang didapat pada uji sitotoksitas. Setelah inkubasi, *cover slip* di fiksasi dengan metanol dingin. Kemudian, *cover slip* di cat menggunakan antibodi yang spesifik terhadap VEGF.

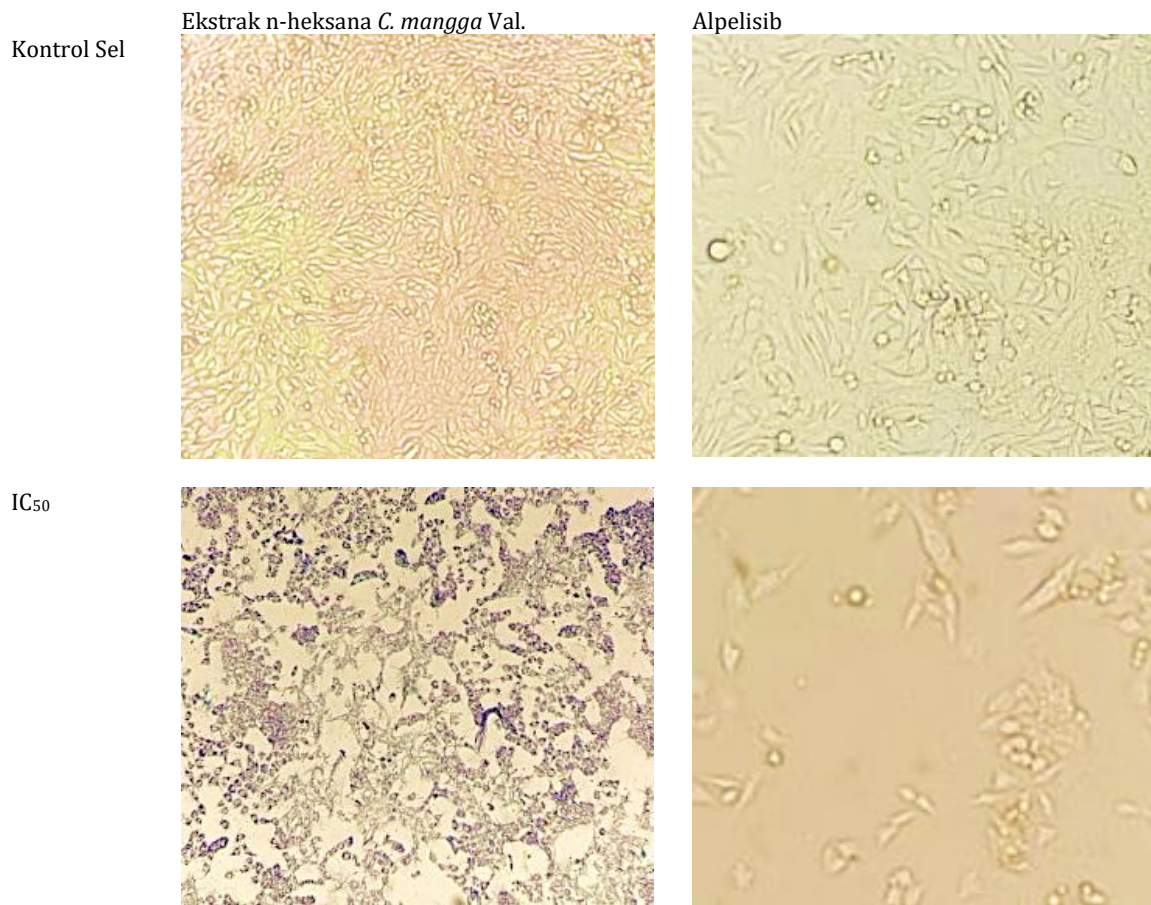
## 3 Hasil dan Pembahasan

### 3.1 Uji Sitotoksitas

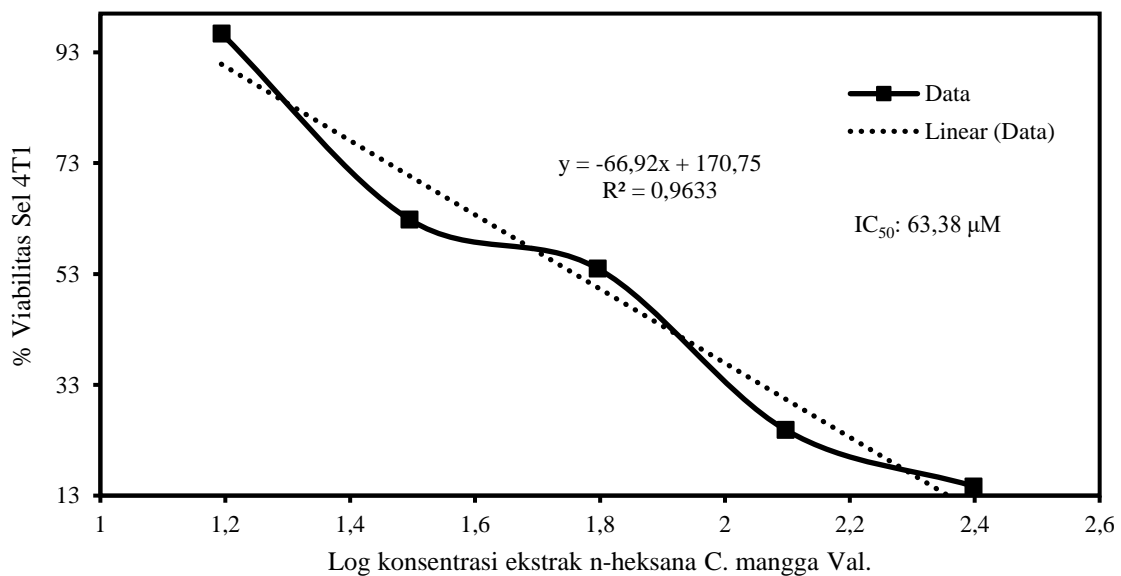
Hasil sitotoksitas ekstrak n-heksana *C. mangga* Val. dan alpelisib pada sel kanker payudara 4T1 terdapat pada gambar 1.

Kontrol sel 4T1 menunjukkan morfologi sel normal dengan densitas sel yang tinggi dan saling bergerombol. Sel 4T1 normalnya berbentuk daun dan lonjong dengan batas antar sel masih terlihat dengan jelas, serta membentuk koloni dengan densitas sel kurang lebih 80% konfluen. Pada perlakuan larutan sesuai  $\text{IC}_{50}$ , terjadi perubahan morfologi sel 4T1. Perubahan yang terjadi adalah ukuran sel yang lebih kecil, bentuk yang lebih bulat, tidak beraturan, serta batas antar sel tidak terlihat jelas jika dibandingkan dengan kontrol sel.

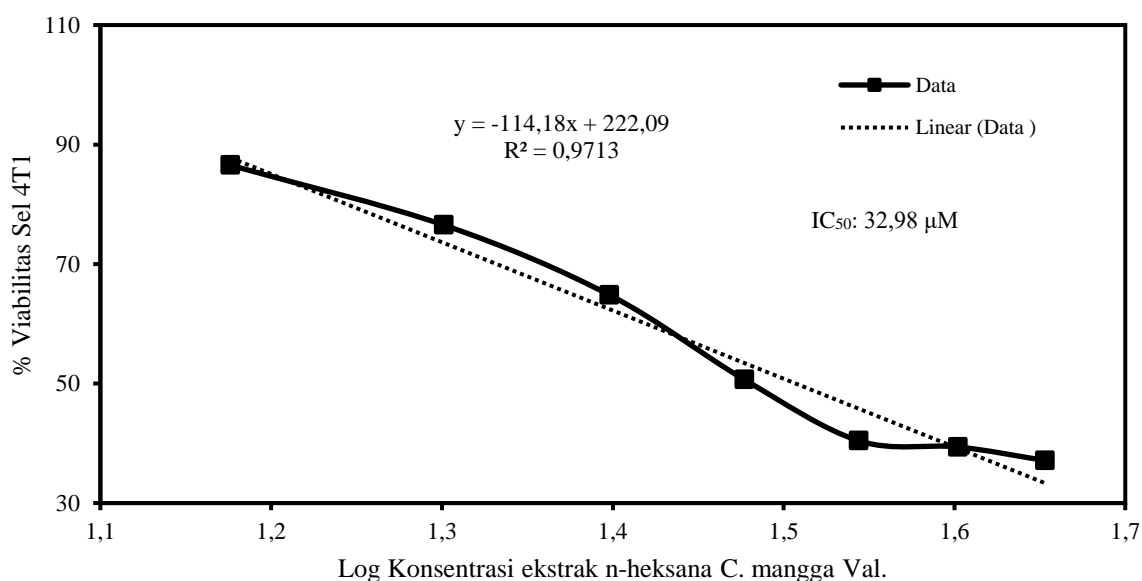
Aktivitas sitotoksik mempengaruhi morfologi sel yang terjadi karena menyebabkan tidak berfungsinya sitoskeleton sel dalam sitoplasma dan protein *cadherin* yang berperan dalam pelekatan sel sehingga hubungan antar sel terlepas. Saat sel terlepas dari dasar *tissue culture flask*, morfologi sel akan berubah karena membrane sel yang tersusun atas lipid bilayer akan berubah menjadi membulat saat terlepas. Pada pemberian dosis tinggi, lebih banyak sel yang akan mengkerut dan kuantitas sel menurun. Pengkerutan sel ini diduga karena sitoskeleton sel terpotong-potong sehingga bentuk sel menjadi tidak beraturan, hal ini merupakan tanda-tanda sel yang sedang menuju kematian [12].



Gambar 1. Efek sitotoksik ekstrak n-heksana *C. mangga* Val. dan alpelisib terhadap viabilitas sel 4T1. Morfologi sel 4T1 setelah diberi perlakuan ekstrak n-heksana *C. mangga* Val. dan alpelisib selama 24 jam dengan replikasi 3×. pengamatan dilakukan di bawah *inverted microscope* dengan perbesaran 20×.



Gambar 2. Kurva regresi sitotoksitas ekstrak n-heksana *C. mangga* Val. pada sel 4T1;  $R^2=0,9633$  dan  $IC_{50} = 63,37 \mu$ M



Gambar 3. Kurva regresi sitotoksitas alpelisib pada sel 4T1; R=0,9713 dan IC<sub>50</sub> = 32,98 µM

Selain itu, aktivitas sitotoksik dapat ditemukan berdasarkan nilai IC<sub>50</sub> yang diperoleh berdasarkan regresi linear dari viabilitas sel dengan konsentrasi perlakuan. Hasil uji sitotoksitas memberikan nilai IC<sub>50</sub> alpelisib sebesar 32,98 µM dan ekstrak n-heksana *C. mangga* Val. sebesar 63,37 µM (Gambar 2 dan 3).

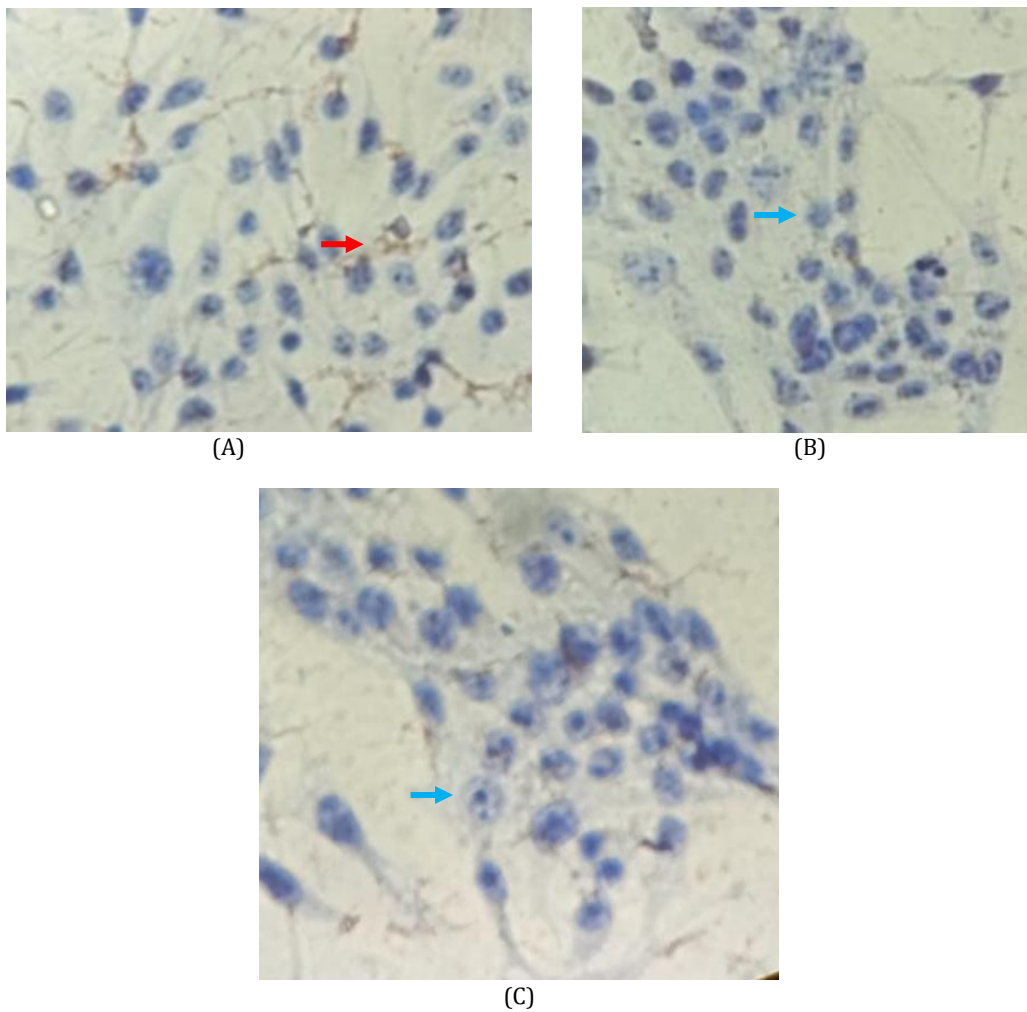
Perlakuan seri konsentrasi ekstrak n-heksana *C. mangga* Val. dan alpelisib menunjukkan efek sitotoksik terhadap sel 4T1 yang bersifat *dose dependent* (Gambar 2 dan 3), yaitu peningkatan konsentrasi menyebabkan penurunan persen viabilitas sel. Berdasarkan hasil IC<sub>50</sub> yang diperoleh, ekstrak n-heksana *C. mangga* Val. memiliki potensi sitotoksik terhadap sel 4T1, karena suatu senyawa bersifat sitotoksik jika memiliki nilai IC<sub>50</sub> <100 µM [13]. Potensi sitotoksik ekstrak n-heksana *C. mangga* Val. kurang kuat dibanding alpelisib, hal ini dapat disebabkan oleh ekstrak n-heksana *C. mangga* Val. masih mengandung beberapa senyawa campuran, selain itu potensi sitotoksitas juga dipengaruhi oleh besaran kadar zat aktif antikanker *C. mangga* Val. yang terkandung dalam ekstrak n-heksana *C. mangga* Val.

### 3.2 Uji Imunositokimia

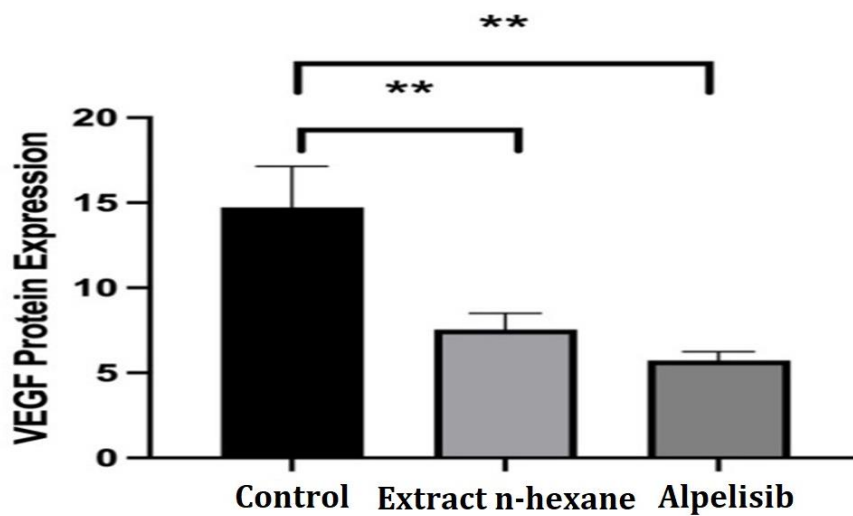
Hasil pengujian imunositokimia hambatan alpelisib dan ekstrak n-heksana *C. mangga* Val. terhadap ekspresi protein VEGF tercantum dalam Gambar 4

Pemeriksaan kualitatif hasil penghambatan protein VEGF menunjukkan bahwa sel yang mengekspresikan protein VEGF akan memberikan warna coklat pada sitoplasma dan disebut dengan ekspresi positif (+), sedangkan yang tidak mengekspresikan protein VEGF akan berwarna biru atau ekspresi negative (-) (Gambar 4).

Ekspresi VEGF ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada sitoplasma yang merupakan kompleks ikatan antara antibodi dengan reseptor VEGF yang ada pada sel 4T1 sehingga sel mengekspresikan VEGF berwarna coklat ketika diberi warna DAB yang mengandung peroksidasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang membentuk kompleks dengan enzim peroksidasi dari reagen imunositokimia Warna biru pada inti diperoleh dari pewarnaan Haemotoksilin-Mayer [14]. Hasil pengamatan sel yang mengekspresikan protein VEGF secara kualitatif berdasarkan sitoplasma berwarna coklat selanjutnya dilakukan pemeriksaan secara kuantitatif dengan kuantifikasi menjadi persentase sel yang mengekspresikan protein VEGF dibandingkan total sel dalam 1 lapang pandang.



Gambar 4. Efek perlakuan ekstrak n-heksan *C. mangga* Val. dan Alpelisib terhadap ekspresi protein VEGF. (A) Kontrol sel; (B) Kelompok perlakuan ekstrak n-heksan *C. mangga* Val.; (C) Kelompok perlakuan Alpelisib. → Hasil Positif, → Hasil Negatif. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 40x



Gambar 5. Efek perlakuan ekstrak n-heksana *C. mangga* Val. dan Alpelisib terhadap ekspresi protein VEGF. Pengamatan dilakukan pada sel 4T1 yang sudah diberi perlakuan selama 24 jam. Hasil menunjukkan perbedaan yang signifikan. \*\*,  $p < 0,05$  (n=4)

Data perhitungan ekspresi protein VEGF (Gambar 5) yang diperoleh kemudian dilakukan analisis statistik. Hasil uji normalitas dan homogenitas menunjukkan bahwa semua kelompok data memiliki data yang 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 antar kelompok. Hasil uji *Tukey* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol terhadap kelompok perlakuan ekstrak n-heksana *C. mangga* Val. dan alpelisib. Uji statistik menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok ekstrak n-heksana *C. mangga* Val. dan alpelisib. Hal ini menandakan bahwa ekstrak n-heksana *C. mangga* Val. memiliki efek penghambatan ekspresi protein yang sama dengan alpelisib.

#### 4 Kesimpulan

Ekstrak n-heksana *Curcuma mangga* Val. bersifat sitotoksik terhadap sel 4T1 dan menghambat ekspresi protein VEGF. Ekstrak n-heksana *Curcuma mangga* Val. mempunyai potensi antikanker payudara *triple negative* melalui penghambatan proses angiogenik.

#### 5 Pernyataan

##### 5.1 Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset dan Teknologi, Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi Republik Indonesia yang telah memberikan dana terhadap penelitian ini.

##### 5.2 Kontribusi Penulis

Semua penulis berkontribusi dalam penulisan artikel ini.

##### 5.3 Penyandang Dana

Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset dan Teknologi, Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi Republik Indonesia.

##### 5.4 Konflik Kepentingan

Semua penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan terhadap naskah ini

#### 6 Daftar Pustaka

- [1] L. A. Torre, F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, and A. Jemal, "Global cancer statistics, 2012: Global Cancer Statistics, 2012," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 65, no. 2, pp. 87–108, Mar. 2015, doi: 10.3322/caac.21262.
- [2] W. D. Foulkes and J. S. Reis-Filho, "Triple-Negative Breast Cancer," *N. Engl. J. Med.*, 2010.
- [3] H. A. Wahba and H. A. El-Hadaad, "Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer," vol. 12, no. 2, 2015.
- [4] V. K. Gadi and N. E. Davidson, "Practical Approach to Triple-Negative Breast Cancer," *J. Oncol. Pract.*, vol. 13, no. 5, pp. 293–300, May 2017, doi: 10.1200/JOP.2017.022632.
- [5] D. Samanta et al., "Chemotherapy induces enrichment of CD47 + /CD73 + /PDL1 + immune evasive triple-negative breast cancer cells," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 115, no. 6, Feb. 2018, doi: 10.1073/pnas.1718197115.
- [6] B. K. Linderholm et al., "Significantly higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and shorter survival times for patients with primary operable triple-negative breast cancer," *Ann. Oncol.*, vol. 20, no. 10, pp. 1639–1646, Oct. 2009, doi: 10.1093/annonc/mdp062.
- [7] S. Greenberg and H. S. Rugo, "Triple-Negative Breast Cancer: Role of Antiangiogenic Agents," *Cancer J.*, vol. 16, no. 1, pp. 33–38, Jan. 2010, doi: 10.1097/PPO.0b013e3181d38514.
- [8] D. Liu and Z. Chen, "The Effect of Curcumin on Breast Cancer Cells," *J. Breast Cancer*, vol. 16, no. 2, p. 133, 2013, doi: 10.4048/jbc.2013.16.2.133.
- [9] A. Albini, F. Tosetti, V. W. Li, D. M. Noonan, and W. W. Li, "Cancer prevention by targeting angiogenesis," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 9, no. 9, pp. 498–509, Sep. 2012, doi: 10.1038/nrclinonc.2012.120.
- [10] E. Astuti, R. Sunarminingsih, U. A. Jenie, S. Mubarika, and S. Sismindari, "Impact of *Curcuma mangga* Val. Rhizome Essential Oil to p53, Bcl-2, H-Ras and Caspase-9 expression of Myeloma Cell Line," *Indones. J. Biotechnol.*, vol. 19, no. 1, p. 23, Dec. 2015, doi: 10.22146/ijbiotech.8631.
- [11] P. Purwanto, P. K. Cahyaningrum, and R. S. Sudibyo, "PERBANDINGAN AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK DAN MINYAK ATSIRI RIMPANG *Curcuma mangga* Val. TERHADAP SEL MCF-7," *J. Penelit. Saintek*, vol. 26, no. 1, pp. 85–94, Jun. 2021, doi: 10.21831/jps.v26i1.39977.
- [12] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of Cancer: The Next Generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

- [13] Z. Baharum, A. Akim, Y. Taufiq-Yap, R. Hamid, and R. Kasran, "In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of Methanolic Plant Part Extracts of *Theobroma cacao*," *Molecules*, vol. 19, no. 11, pp. 18317–18331, Nov. 2014, doi: 10.3390/molecules191118317.
- [14] "Search: vegf - The Human Protein Atlas.html."