

Laporan Hasil Penelitian**TOKSISITAS SENYAWA TEMBAGA(II)KLORIDA DIHIDRAT TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T74D SECARA *IN VITRO*****Teguh Hari Sucipto¹⁾, Harsasi Setyawati²⁾, Fahimah Martak³⁾**¹⁾Kelompok Studi Dengue, Lembaga Penyakit Tropis, Universitas Airlangga, Indonesia²⁾Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Indonesia³⁾Departemen Kimia, Fakultas Ilmu Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Indonesia**ABSTRACT**

Cancer is a transformation of normal cells in the body into malignancy due to the induction of carcinogens. Breast cancer is the second leading cause of death in Indonesia. The field of treatment with inorganic compounds has been widely developed and shows better anticancer activity than organic compounds. This research aims to know the toxicity level of copper(II)chloride dihydrate compound using MTT method (3--4,5-dimethylthiazole-2-yl) -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide} in vitro test of breast cancer cell T74D. Toxicity in copper(II)chloride dihydrate obtained IC₅₀ value of 29.021 µg/ml. The value of IC₅₀ obtained <100 µg/ml so that the copper(II)chloride dihydrate compound belongs to the category of medium toxicity compound (medium toxic). Copper is potentially toxic to cells because copper charge can cause cell inactivation directly between metal-protein interactions.

Keywords : Copper(II)chloride dihydrate, toxicity, breast cancer, *in vitro***Correspondence to** : teguhharisucipto@staf.unair.ac.id**ABSTRAK**

Kanker adalah transformasi sel normal dalam tubuh menjadi ganas karena adanya induksi karsinogen. Kanker payudara adalah kanker penyebab kematian kedua di Indonesia. Bidang pengobatan dengan senyawa anorganik telah banyak dikembangkan dan menunjukkan aktivitas antikanker yang lebih baik daripada senyawa organik. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat toksisitas senyawa tembaga(II)klorida dihidrat dilakukan dengan metode MTT {3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromida} uji *in vitro* sel kanker payudara T74D. Toksisitas pada tembaga(II)klorida dihidrat diperoleh nilai IC₅₀ sebesar 29,021 µg/ml. Nilai IC₅₀ yang diperoleh <100 µg/ml sehingga senyawa tembaga(II)klorida dihidrat termasuk dalam kategori senyawa toksisitas tingkat medium (*medium toxic*). Tembaga berpotensi beracun bagi sel, disebabkan karena muatan tembaga dapat menyebabkan inaktivasi sel secara langsung antara interaksi logam-protein.

Kata kunci : Tembaga(II)klorida dihidrat, toksisitas, kanker payudara, *in vitro***Korespondensi** : teguhharisucipto@staf.unair.ac.id

PENDAHULUAN

Kanker adalah suatu penyakit sel dengan ciri gangguan atau kegagalan mekanisme pengatur multiplikasi dan fungsi homeostatis lainnya pada organisme multiseluler. Menurut Franks dan Teich (1998), sel kanker itu timbul dari sel normal tubuh kita sendiri yang mengalami transformasi menjadi ganas, karena adanya mutasi spontan atau induksi karsinogen (bahan/agen pencetus terjadinya kanker).

Kanker payudara adalah penyakit yang ditandai dengan terjadinya pertumbuhan berlebihan atau perkembangan tidak terkendali dari sel-sel atau jaringan payudara. Kanker payudara merupakan penyakit kanker yang menjadi penyebab kematian kedua paling tinggi di Indonesia. Kanker ini banyak menyerang perempuan berusia antara 18 sampai 54 dan kematian akibat kanker payudara terjadi pada perempuan usia 45-50 (Lee, 2008). Menurut Kementerian Kesehatan Republik Indonesia pada tahun 2016 diperkirakan terdapat 4030 kasus terjadi pada tahun 2007 – 2016 (Anonimus, 2017).

Di sisi lain, senyawa anorganik terus dikembangkan menjadi senyawa yang bermanfaat dalam bidang pengobatan. Beberapa senyawa anorganik yang berhasil disintesis menunjukkan aktivitas yang baik dalam bidang kimia medisinal. Logam tembaga(II) merupakan unsur esensial dan berperan penting dalam sistem biologi tubuh manusia (Linder dan Azam, 1996). Logam tembaga berperan dalam tubuh sebagai konstituen enzim redoks dan hemocyanin (Huheey et al., 1993). Logam tembaga(II) dan ligan 2-benzimidazolkarbamat telah dikomplekskan (Guadarrama et al., 2009) dan dilakukan uji aktivitas sitotoksik pada 6 sel kanker yaitu kanker prostat (PC3), kanker payudara (MCF-7), kanker kolon (HCT-15), kanker serviks uterin (HeLa), kanker paru-paru (SKLU-1). Berdasarkan

hasil uji tersebut, senyawa kompleks yang dihasilkan aktif pada sel kanker HeLa dan HCT-15 dengan nilai IC_{50} yang masing-masing sebesar 95,59 dan 26,72 μM . Beberapa senyawa anorganik logam Cu dengan ligan imidazol terbukti aktif sebagai senyawa antikanker. Kompleks logam dengan ligan menunjukkan aktivitas antikanker yang lebih baik daripada ligan bebas (Devereux et al., 2004). Nilai IC_{50} yang dihasilkan pada kompleks $[Cu(BZA)_2(phen)(H_2O)]$ untuk sel kanker Hep-G2 sebesar $9,5 \pm 2,1 \mu M$ dan A-498 sebesar $21,3 \pm 6,7 \mu M$ pada konsentrasi larutan 0,1 μM – 1000 μM . Toksisitas tersebut lebih baik daripada ligan bebas yang sebesar $>1000 \mu M$ untuk Hep-G2 dan A-498 (Devereux et al., 2007).

Pada penelitian ini uji antikanker senyawa tembaga(II)klorida dihidrat dilakukan dengan metode MTT {3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5 - difenil - tetrazolium bromida} uji *in vitro* sel kanker payudara T74D. Adapun klasifikasi tingkat toksisitas suatu senyawa berdasarkan IC_{50} (Meyer et al., 1982), yaitu kategori sangat tinggi (*highly toxic*) apabila mampu membunuh 50% larva pada konsentrasi 1–10 $\mu g/ml$, kategori sedang (*medium toxic*) pada konsentrasi 10–100 $\mu g/ml$, dan kategori rendah (*low toxic*) pada konsentrasi 100–1000 $\mu g/ml$.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tembaga(II)klorida dihidrat ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) (Merck 99,0%), dimetil sulfoksida (DMSO) (Merck 99,8%), aquades, sel kanker payudara T74D (CVCL_0553), Gibco Advanced RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 Medium, Phosphate-buffered saline 1X (PBS 1X) (Gibco), dan Thiazoyl blue tetrazolium bromide (MTT) (Bio Basic).

Uji toksisitas terhadap sel kanker

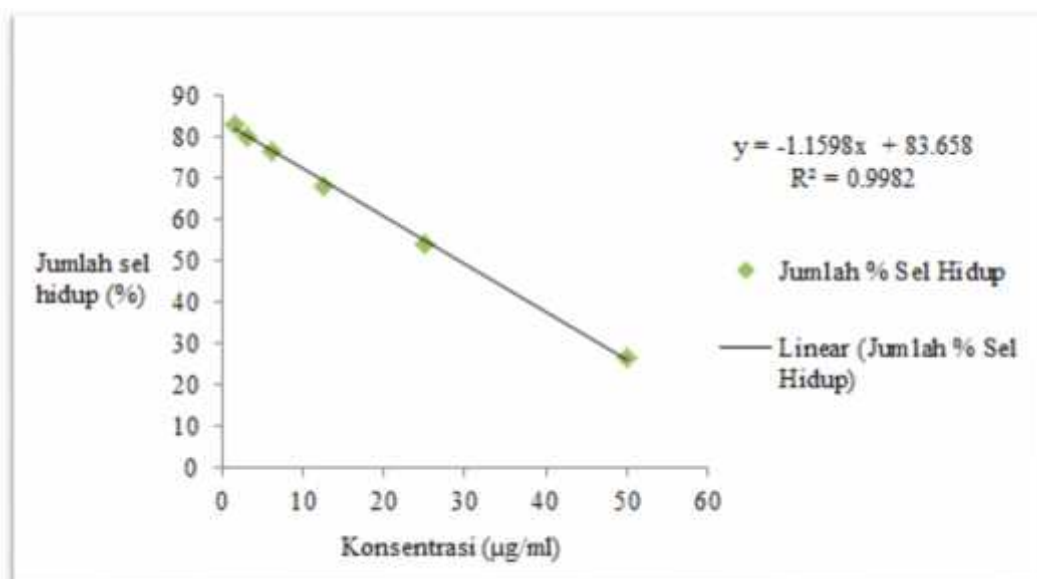
Sel kanker payudara T74D dengan kepadatan 5×10^3 sel/sumuran didistribusikan ke dalam plate 96 sumuran, diinkubasi selama 24 jam pada inkubator CO₂ suhu 37 °C untuk beradaptasi dan menempel di dasar sumuran. Dicuci PBS 3 kali kemudian ditambahkan 200 µL medium RPMI yang mengandung DMSO 0,1% (kontrol), senyawa kompleks dengan konsentrasi 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; dan 1,56 µg/mL dalam RPMI dengan DMSO 0,1%, dan diinkubasi 20 jam pada inkubator CO₂ suhu 37°C. Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung sampel dibuang dan dicuci dengan 100 µL PBS. Kemudian ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan 100 µL RPMI yang mengandung 5 mg/ml MTT, inkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37 °C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan. Setelah 4 jam, media yang mengandung MTT dibuang, dicuci PBS kemudian ditambahkan larutan DMSO 50 µL untuk melarutkan Kristal formazan. Dihomogen di atas *shaker* selama 10 menit kemudian dibaca dengan Microplate reader pada panjang gelombang 595 nm.

HASIL PENELITIAN

Pada penelitian ini uji bioaktivitas dilakukan dengan metode MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide) (Mosmann, 1983) menggunakan sel kanker payudara T74D. Uji ini untuk menentukan sifat toksisitas suatu senyawa. Sel yang hidup dihitung dengan *micoplate reader* setelah diinkubasi selama 20 jam. Persentase penghambatan perkembangan sel kanker payudara T74D oleh sampel uji dari kompleks tembaga(II)klorida dihidrat disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Data jumlah sel kanker yang hidup pada variasi konsentrasi larutan senyawa tembaga(II) klorida dihidrat

Konsentrasi (µg/ml)	Jumlah Sel Hidup (%)
50	26,369
25	53,741
12,5	67,974
6,25	76,46
3,13	80,201
1,56	83,029



Gambar 1. Kurva uji MTT senyawa tembaga(II)klorida dihidrat

Berdasarkan Tabel 1 dapat diamati bahwa semakin tinggi konsentrasi larutan uji, semakin tinggi pula kematian sel. Hal ini menunjukkan bahwa toksisitas suatu senyawa dipengaruhi oleh konsentrasi senyawa tersebut. Dari tabel tersebut dibuat kurva hubungan antara konsentrasi sampel uji dan persentase jumlah sel hidup seperti pada Gambar 1. Berdasarkan kurva tersebut diperoleh persamaan regresi linier, kemudian dihasilkan nilai IC_{50} .

Berdasarkan kurva uji MTT senyawa tembaga(II)klorida dihidrat seperti pada Gambar 1, diperoleh nilai IC_{50} sebesar 29,021 $\mu\text{g/ml}$.

Pada Gambar 2 terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi senyawa tembaga(II) klorida dihidrat banyak sel yang mati. Hal ini terjadi karena pada konsentrasi tinggi senyawa tersebut bersifat toksik, sehingga dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan sel (Sucipto et al., 2017).



Gambar 2. Sel kanker payudara T74D setelah perlakuan

PEMBAHASAN

Tembaga berperan penting dalam mekanisme homeostatik di dalam tubuh manusia, akan tetapi paparan berlebih dapat menyebabkan efek yang berbahaya bagi kesehatan. Paparan tembaga terhadap tubuh dapat menimbulkan kerusakan lemak, DNA dan protein (Sucipto et al., 2017). Muatan positif logam juga terlibat dalam interaksi elektrostatik dengan muatan negatif pada gugus gula-fosfat yang terdapat di *backbone* DNA (Chauhan et al., 2006). Sifat kimia tembaga berperan dalam banyak fungsi biologis seperti transfer elektron, katalisis, dan pembentukan struktur. Kemampuan untuk siklus antara +1 dan +2 keadaan oksidasi adalah salah satu fitur yang telah dieksplotasi oleh organisme sepanjang proses evolusioner. Karena tembaga berpotensi beracun bagi sel, juga mekanisme penanganan tembaga yang telah dikontrol dengan baik telah berevolusi (Tardito et al., 2009). Berdasarkan beberapa penelitian sebelumnya diketahui bahwa Cu(II) merupakan logam yang baik dan dapat digunakan dalam sintesis senyawa kompleks. Tembaga(II) menunjukkan aktivitas antikanker dan antimikroba yang lebih baik daripada ion logam lain seperti Ni(II) (Afrasiabi et al., 2003), Co(II) (Dhahagani et al., 2014), VO(II) (Dhahagani et al., 2014), Ni(II) (Galal et al., 2009), dan Fe(II) (Galal et al., 2009).

Pada 2500 tahun sebelum masehi, bangsa Cina telah menggunakan logam sebagai terapi atau pengobatan penyakit. Logam yang digunakan adalah logam emas (Merchant, 1998). Emas dapat digunakan untuk terapi HIV dan pengobatan kanker (Panyala et al., 2009).

Berdasarkan nilai IC_{50} pada penelitian ini, senyawa tembaga(II)klorida dihidrat termasuk kategori senyawa toksisitas medium (*medium toxic*) (Meyer dkk., 1982). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya

dimana senyawa CuL ($L = 3-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)-2,6-dioxopiperidine-1-carbodithioate$) membunuh sel kanker lebih banyak daripada ligan bebasnya (Ali et al., 2013). Hasil IC_{50} senyawa tembaga(II)klorida dihidrat pada penelitian ini lebih besar dibandingkan pada penelitian sebelumnya, dimana uji MTT dilakukan pada kompleks $[Cu(TBZH)_2(BZA)] \cdot (BZA) \cdot 0.5TBZH \cdot H_2O$ dimana ligan TBZH adalah 2-(4'-thiazol)benzimidazol dan ligan BZA adalah asam benzoik, dihasilkan IC_{50} sebesar 32 μM (Deverux et al., 2007).

Sel dapat mati dengan cara yang berbeda sebagai konsekuensi dari oksidatif yang kuat: kematian sel pasif, seperti nekrosis yang disebabkan oleh terganggunya keseimbangan osmotik atau apoptosis, sedangkan kematian sel aktif disebabkan oleh *caspases* (Tardito et al., 2009). Berdasarkan penelitian sebelumnya, jenis kematian sel ditandai oleh vakuolisasi sitoplasma yang sebagian besar diturunkan oleh retikulum endoplasma dan dengan tidak adanya *caspases* (protease sistein). Muatan tembaga dapat menyebabkan inaktivasi sel secara langsung antara interaksi logam-protein. Aktivitas enzimatis *caspases* yang diatur oleh modifikasi oksidatif residu sistein dan *caspases* dihambat oleh disulfiram dengan membentuk hubungan langsung antara protein belerang dan obat (Sperandio et al., 2000).

KESIMPULAN

Toksistas pada tembaga(II)klorida dihidrat dilakukan dengan metode MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide) dan diperoleh nilai IC_{50} sebesar 29,021 $\mu g/ml$. Nilai IC_{50} yang diperoleh <100 $\mu g/ml$ sehingga senyawa tembaga(II)klorida dihidrat termasuk dalam kategori senyawa toksistas tingkat medium (*medium toxic*).

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga, Pusat Unggulan Ipteks Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia; dan Pusat Penelitian dan Pengembangan Stem Cell Universitas Airlangga.

DAFTAR PUSTAKA

- Afrasiabi, Z., Sinn, E., Padhye, S., Dutta, S., et al., (2003), Transition Metal Complexes of Phenanthrenequinone Thiosemicarbazone as Potential Anticancer Agents: Synthesis, Structure, Spectroscopy, Electrochemistry and In vitro Anticancer Activity Against Human Breast Cancer Cell-line, T47D, *J of Inorganic Biochem.*, Vol.95, pp. 306-14.
- Ali, I., Waseem, AW., Kishwr, S., Ming-Fa S.,(2013), Design and Synthesis of Thaliomide Based Dithiocarbamate Cu(II), Ni(II) and Ru(III) Complexes as Anticancer Agents, *Polyhedron*, Vol.56, pp.134-43.
- Anonimus, (2017), Data dan Informasi Profil Kesehatan Indonesia 2016, (Diunduh pada: 21 Februari 2018 pada: <http://www.depkes.go.id/resources/download/pusdatin/lain-lain/Data%20dan%20Informasi%20Kesehatan%20Profil%20Kesehatan%20Indonesia%202016%20-%20%20smaller%20size%20-%20web.pdf>).
- Chauhan, M., Farukh, A., (2006), Chiral and Achiral Macrocyclic Copper(II) Complexes: Synthesis, Characterization, and Comparative Binding Studies with Calf-Thymus DNA, *Chem. and Biodiversity*, Vol.3, pp.660-76.
- Devereux, M., McCann, M., Shea, DO., Kelly, R., et al., (2004), Synthesis, Antimicrobial Activity and Chemotherapeutic Potential of Inorganic Derivatives of 2-(4'-thiazolyl) benzimidazole {thiabenzazole}: X-ray Crystal Structure of $[Cu(TBZH)_2Cl]Cl \cdot H_2O \cdot EtOH$ and $TBZH_2NO_3$, *J of Inorganic Biochem.*, Vol.98, pp.1023-31

- Devereux, M., Shea, DO., Kellett, A., McCann, M., *et al.*, (2007), Synthesis, X-ray Crystal Structures and Biomimetic and Anticancer Activities of Novel Copper(II)benzoate complexes incorporating 2-(4-thiazolyl) benzimidazole (thiabenzole), 2-(2-pyridyl) benzimidazole and 1,10-phenanthroline as Chelating Nitrogen Donor Ligands, *J of Inorganic Biochem.*, Vol.101, pp.881-92.
- Dhahagani, K., Kumar, SM., Chakkaravarthi, G., Anitha, K., *et al.*, (2014), Synthesis and spectral characterization of Schiff base complexes of Cu(II), Co(II), Zn(II) and VO(IV) containing 4-(4-aminophenyl) morpholine derivatives: Antimicrobial evaluation and anticancer studies, Elsevier, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomol. Spectroscopy*, Vol.117, pp. 87-94.
- Franks, LM., Teich, NM., (1998), *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*, Oxford University Press, New York.
- Galal, SA., Hegab, KH., Kassab, AS., Rodrigues, ML., *et al.*, (2009), New Transition Metal Ion Complexes with Benzimidazole-5-carboxylic Acid Hydrazides with Antitumor Activity, *European J of Med. Chem.*, Vol. 44, pp. 1500-8.
- Guadarrama, OS., Horacio, LP., Francisco, SB., Isabel, GM., *et al.*, (2009), Cytotoxic Activity, X-Ray Crystal Structures and Spectroscopic Characterization of Cobalt(II), Copper(II) and Zinc(II) Coordination Compounds with 2-substituted Benzimidazole, *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol. 103, Hal. 1204-1213.
- Huheey, JE., Ellen, AK., Richard, LK., (1993), *Inorganic Chemistry: Principle of Structure and Reactivity*, Harper Collins College, United States of America.
- Lee, JR., (2008), *Kanker Payudara Pencegahan dan Pengobatannya*, Daras Books, Jakarta.
- Linder, MC., Maryam, HA., (1996), Copper Biochemistry and Molecular Biology, *Am. J of clin. Nutrition*, Vol.63, pp. 797-811.
- Merchant, B., (1998), Gold, the noble metal and the paradoxes of its toxicology, *Biologicals J*, Vol.26, pp.49-59.
- Meyer, BN., Ferrighi, NR., Putnam, JE., Jacobsen, LB., *et al.*, (1982), Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for active Plant Constituents, *Planta Medica*, Vol.45, pp.31-4.
- Mosmann, T., (1983), Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J of Immunol. Methods*, Vol.65, pp.55-63.
- Panyala, NR., Peña-Méndez, E., Havel, J., (2009), Gold and nano-gold in medicine: Overview, toxicology and perspectives, *J of applied biomed.*, Vol.7, pp.75-91.
- Sperandio, S., Belle, I., Bredesen, DE., (2000), An alternative, nanopoptotic form of programmed cell death, *PNAS*, Vol.97, pp.14376-81.
- Sucipto, TH., Churrotin, S., Setyawati, H., Kotaki, T., *et al.*, (2017), Antiviral Activity of Copper(II)Chloride Dihydrate Against Dengue Virus Type-2 in Vero Cell, *Indonesian J of Tropical and Infectious Dis.*, Vol.6, pp. 84-7.
- Sucipto TH, Churrotin S, Setyawati H, Mulyatno KC, Amarullah IH, Ueda S, Kotaki T, Sumarsih S, Wardhani P, Bendryman SS, Aryati, Soegijanto S, Kameoka M, (2017), Inhibitory Activity of Cobalt(II)-Morin Complex Against The Replication of Dengue Virus Type 2, *Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease*, Vol. 6, Hal. 141-144.
- Tardito, S., Marchio, L., (2009), Copper compounds in anticancer strategies, *Curr. Med. Chem.*, Vol.16, pp.1325-48.